



Etude des interactions des peptides beta-amyloïdes et membranes cellulaires : transport et toxicité

Ivan Bello

► To cite this version:

Ivan Bello. Etude des interactions des peptides beta-amyloïdes et membranes cellulaires : transport et toxicité. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2014. Français. NNT : 2014PA132002 . tel-01235388

HAL Id: tel-01235388

<https://theses.hal.science/tel-01235388>

Submitted on 30 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS 13 – SORBONNE PARIS CITE

U.F.R. Sciences, Médecine, Biologie Humaine

□

N° attribué par la bibliothèque

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline : Chimie-Biomolécules

Présentée et soutenue publiquement

Par

Ivan BELLO

Le 12 mai 2014

Etude des interactions des peptides beta-amyloïdes et membranes cellulaires: transport et toxicité

Directrice de thèse

Mme Milena SALERNO

JURY

M. Stéphane ORLOWSKI, chercheur CEA Saclay

M. Nelson ARISPE, Research Professor, Uniformed Services University of the Health Sciences, U.S.A.

M. Olivier OUDAR, Professeur des Universités, Université Paris 13

Mme. Milena SALERNO, Maître de conférences, Université Paris 13

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse

« A chi ha un cervello non manca il cappello »

Qui a un cerveau trouve un chapeau

Proverbe italien

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT), UMR CNRS 7244, à l'UFR SMBH de l'Université Paris 13.

Je remercie d'abord au laboratoire d'accueil de m'avoir permis de développer le projet de recherche dont les résultats sont présentés tout au long de ce mémoire.

Je remercie à la fondation FUNDAYACUCHO de m'avoir accordé le financement pour la réalisation de cette thèse, dans le cadre des accords de coopération entre la France et le Venezuela.

Je remercie aux membres du jury, M. Stéphane Orlowski, M. Nelson Arispe et M. Olivier Oudar d'avoir accepté d'évaluer ce travail. C'est avec honneur que je reçois ce geste.

Je souhaite remercier infiniment à ma directrice de thèse, Mme Milena Salerno, pour les connaissances transmises lors de la réalisation de cette thèse, sa disponibilité, la liberté concédée à mes idées pour entreprendre la résolution des problèmes scientifiques, les discussions de très haut niveau lors de la conception de stratégies permettant d'avoir de résultats, sa veille sans cesse afin d'assurer la disponibilité de toutes les ressources nécessaires pour le bon déroulement du travail ainsi que l'encouragement pour l'assistance aux différents congrès et colloques scientifiques dont j'ai eu l'opportunité de participer.

Des lignes très spéciales et chaleureuses méritent d'être adressées au Professeur Arlette Garnier-Suillerot. Je lui remercie d'avoir partagé son expérience et donné des conseils toujours avisés. Mme Garnier-Suillerot possède ce que les italiens appellent communément « sapienza » (sagesse), toujours

démontrée lors de nos échanges, et qui m'a fait remonter aux temps où les grands philosophes semaient des grandes idées. Merci d'être un exemple vivant de cette pensée de Platon : « Le sage parle quand il a quelque chose à dire ».

Des remerciements sont aussi adressés aux personnes de cette équipe de recherche que j'ai eu l'opportunité de côtoyer, ainsi qu'aux doctorants d'autres disciplines scientifiques du laboratoire. Il en est de même pour les doctorants travaillant ou ayant travaillé sous la direction de Mme Salerno dont Diego Santo-Domingo, à qui je lui souhaite un fort succès dans la réalisation de sa thèse.

Ma pensée se dirige aussi vers ma mère, mes frères et toute ma famille, car, malgré la distance géographique, ils m'ont apporté un énorme soutien. Très spécialement, je remercie ma mère de m'avoir élevé en tant qu'être humain. Il est évident que sans elle, je n'aurai pas arrivé à ce sommet personnel et professionnel.

Je pense aussi à mes amis, dont certains d'entre eux n'ont pas pensé aux frontières ni aux heures de vol pour venir me rendre visite tout au long de mon doctorat. Je leur remercie d'avoir fait des efforts pour atteindre cet objectif.

J'adresse aussi des remerciements singulièrement vifs à Jacabel Martinez, pour m'avoir accordé un sincère soutien jour après jour. C'est une amitié dont je me permettrai de me réjouir toute ma vie. Il n'y aura pas de lignes suffisantes pour exprimer ma gratitude vers toi.

Finalement, je dédie entièrement ce travail à ma mère, même si celui-ci n'est pas suffisant pour remercier tout ce que j'ai reçu d'elle.

Abréviations

A β	Peptide beta amyloïde
A β 40	Peptide beta amyloïde de 40 acides aminés
A β 42	Peptide beta amyloïde de 42 acides aminés
ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
APP	Protéine précurseur du peptide amyloïde
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BACE1	β -sécrétase 1
bFGF	Facteur basique de croissance de fibroblastes
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BSA	Albumine du sérum bovin
CPPs	Cell-penetrating peptides
[Ca ²⁺] _i	Concentration intracellulaire de Calcium
[Cl] _i	Concentration intracellulaire de Chlorure
DMSO	Dimethylsulfoxyde

DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
GABA	Acide γ -aminobutyrique
HFIP	Hexafluorure d'Isopropanol
hCMEC/D3	Lignée cellulaire d'origine endothéliale humaine
K562	Lignée cellulaire d'origine érytrophoblastique humaine ne surexprimant pas la P-gp
K562/ADR	Lignée cellulaire d'origine érytrophoblastique humaine surexprimant la P-gp
Log D	Coefficient de partition Octanol/Tampon
LRP1	Récepteur pour les lipoprotéines de faible densité
MDR	Résistance aux drogues multiples
MQAE	<i>N</i> -(Ethoxycarbonylmethyl)-6-Methoxyquinolinium Bromide
MRP1	Protéine associée à la résistance aux drogues multiples
NBD	Domaine d'union aux nucléotides
Pi	Phosphate inorganique
P-gp	P-Glycoprotéine
ROS	Espèces réactives d'oxygène
SDS	Dodécyl sulfate de sodium

SH-SY5Y	Lignée cellulaire d'origine neuronale humaine
SNC	Système Nerveux Centrale
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFE	Trifluoroéthanol
ThT	Thioflavine T
TMR	Tetramethylrosamine
Ψ_{mit}	Potentiel membranaire mitochondriale
$\Delta\Psi_{mit}$	Variation du potentiel membranaire mitochondriale
Δp	Force proton-motrice

Table de matières

Introduction	10
Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer : généralités et principaux acteurs moléculaires.....	14
1.1.- La maladie d'Alzheimer : généralités et aspects cliniques.....	15
1.2.- Acteurs moléculaires à l'origine de la maladie d'Alzheimer	20
1.2.1.- La protéine précurseur du peptide amyloïde	20
1.2.2.- Les sécrétases.....	22
1.2.3.- Les peptides amyloïdes (A β)	22
1.3.- Les peptides A β sont-ils nécessaires pour la fonction neuronale ?	25
Chapitre 2 : L'agrégation du peptide amyloïde à l'origine de la maladie d'Alzheimer.....	27
2.1.- Le phénomène d'agrégation des peptides amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer	28
Chapitre 3 : Effets toxiques du peptide amyloïde au niveau neuronal.....	37
3.1.- Mécanisme de toxicité du peptide amyloïde dans les cellules	38
3.1.1. Altérations au niveau de la membrane plasmique	38
3.2.2. Dysfonctionnement de la mitochondrie et stress oxydant	42
3.3.3. Les dégénérescences neurofibrillaires	44
Chapitre 4 : La barrière hémato-encéphalique, ses transporteurs et leur rôle dans le développement de la maladie d'Alzheimer.....	47
4.1.- La barrière hémato-encéphalique (BHE).....	48
4.2.- La barrière hémato-encéphalique vis à vis de la perméabilité	50
4.3.- Les transporteurs ABC	51
4.4.- La P-Glycoprotéine (P-gp).....	52
4.4.1. Le cycle catalytique du transport de substrats par la P-gp.....	55
4.5.- Les voies physiologiques de l'influx et de l'efflux des peptides A β à travers la BHE61	
4.6.- La P-gp et le transport des peptides amyloïdes	62
Chapitre 5 : Matériels et Méthodes	67

5.1- Les appareils utilisés	68
5.1.1.- Le compteur de cellules	68
5.1.2.- Les sonicateurs	68
5.1.3.- Les centrifugeuses	68
5.1.4.- Le spectrophotomètre d'absorption électronique	69
5.1.5.- Le spectrofluorimètre	69
5.1.6.- Le générateur de courant	69
5.2.- Les lignées cellulaires	70
5.3.- Les milieux de culture	71
5.4.- Solubilisation du peptide amyloïde A β 42	72
5.5.- Obtention des oligomères d'A β 42.....	73
5.6.- Electrophorèse en gels de polyacrylamide en présence de dodecylsulfate de sodium (SDS-PAGE)	73
5.7.- Détection des protéines séparées par électrophorèse par coloration utilisant le nitrate d'argent.....	74
5.8.- Préparation des vésicules de membranes de cellules K562/ADR.....	77
5.9.- Détermination de la concentration de protéines par la méthode de Bradford	79
5.10.- Détermination de l'activité ATPase de la P-gp dans des vésicules de membrane	79
5.11.- Mesure de la vitesse d'efflux d'une anthracycline par la P-gp	81
5.12. Mesure de la toxicité du peptide A β 42	83
5.12.1 - Essais de toxicité du peptide A β 42 dans les lignées cellulaires K562, K562/ADR et SH-SY5Y	83
5.12.2.- Détermination de la concentration intracellulaire de Chlorure (Cl ⁻)	85
5.12.3. - Mesure du potentiel de membrane mitochondriale (Ψ_{mit}) des cellules SH-SY5Y en présence et en absence du peptide A β 42.....	87
Chapitre 6 : Résultats et Discussion.....	89
6.1.- Préparation des solutions du peptide A β 42 et étude de son agrégation en fonction du temps.....	90

6.2.- Effet de A β 42 sur l'activité ATPase de la P-gp dans des vésicules de membrane des cellules K562/ADR.....	93
6.3.- Effet du peptide A β 42 sur le transport de la Pirarubicine par la P-glycoprotéine dans les lignées cellulaires K562/ADR et hCMEC/D3	96
6.4.- Toxicité du peptide A β 42.....	101
6.4.1.- Evaluation des effets toxiques du peptide A β 42 dans les lignées cellulaires K562, K562/ADR et SH-SY5Y : survie cellulaire	101
6.4.2.- Evaluation des effets toxiques du peptide A β 42 dans la lignée cellulaire SH-SY5Y : modifications de la concentration intracellulaire de chlorure.....	102
6.4.3.- Evaluation des effets toxiques du peptide A β 42 dans la lignée cellulaire SH-SY5Y : modifications du potentiel membranaire mitochondriale.	106
6.5.- Discussion	109
6.5.1.- Transport du peptide A β 42 par la P-gp	109
6.5.2.- Toxicité du peptide A β 42	124
Chapitre 7 : Modulation de l'efflux de la Pirarubicine par des molécules susceptibles d'inhiber le fonctionnement de la	131
P-glycoprotéine	131
7.1.1.- Contexte	132
7.1.2.- Méthodologie	137
7.1.3.- Expression des résultats	142
7.2.- Résultats	142
7.3.- Discussion	145
Conclusions et Perspectives	148
Références Bibliographiques.....	152

□

□

□

□

Introduction□

La maladie d'Alzheimer est devenue, au fil des années, le désordre neurodégénératif le plus fréquent chez les personnes âgées chez qui elle se manifeste par un déclin cognitif. Cette maladie se caractérise principalement par deux types de lésions: les plaques amyloïdes, formées d'agrégats de peptides A β , et les dégénérescences neurofibrillaires. Depuis la découverte de cette maladie, il y a plus de cent ans, de nombreuses équipes de recherche se sont attelées à la tâche de déterminer son origine et, à concevoir et développer des stratégies thérapeutiques. Cependant, nous sommes encore loin de comprendre les éléments intervenant dans la pathogénèse de cette maladie.

En bref, la maladie d'Alzheimer se caractérise par l'accumulation dans le cerveau de peptides et en particulier du peptide A β 42 qui s'avère être le plus toxique. Ce peptide doit être éliminé du cerveau et le transporteur P-glycoprotéine (P-gp) présent dans la Barrière Hémato Encéphalique (BHE) a été proposé comme intervenant dans ce processus. Ce point est l'objectif essentiel de notre thèse, à savoir la relation entre peptide A β 42 et P-gp, qui représente le fruit de trois années et demi de travail qui aboutissent à porter une contribution dans le domaine du développement de cette maladie.

Les chapitres 1 à 4 de cette thèse illustrent la complexité de la maladie d'Alzheimer et de la BHE. En fonction des objectifs de cette thèse, établis ci-dessus, différentes approches expérimentales ont été utilisées. Celles-ci sont présentées en détails dans le chapitre 5, tandis que les résultats des expériences réalisées afin d'atteindre les objectifs sont décrites dans le chapitre 6. Une analyse approfondie de toutes les données expérimentales est également développée tout au long de ce chapitre. Le chapitre 7 aborde l'étude de la capacité de nouvelles molécules à inhiber le transport de la P-gp. Les conclusions dérivées de ce travail ainsi que les perspectives occupent le chapitre 8.

Dans cette thèse, nous nous sommes attachés essentiellement à l'étude du rôle de la P-gp dans l'accumulation du peptide A β 42 dans le cerveau et différentes expériences ont été réalisées afin de répondre aux trois questions suivantes:

1.- Le peptide A β 42 peut-il être un substrat de la P-gp ?

En raison de la divergence des opinions, appuyées sur des résultats expérimentaux, nous avons décidé de faire une étude visant à confirmer ou contredire la proposition d'un transport de A β 42 par la P-gp. Il est très difficile de montrer réellement le transport d'une molécule par la P-gp, de telles expériences n'ont été effectuées que dans de rares cas. Cependant, il y a un certain nombre de critères, relativement faciles à vérifier, qui doivent être remplis pour qu'une molécule (M) puisse être un substrat de la P-gp. Ces critères sont :

- La modification ou non de l'activité ATPase de la P-gp, en présence de (M), en sachant qu'il a été proposé que l'hydrolyse d'ATP ait lieu lors du transport de M
- La modulation de la vitesse d'efflux d'un substrat de la P-gp par (M)

Dans le cas où aucun de ces critères n'est rempli, on peut « conclure » que la molécule (M) n'est pas substrat de la P-gp.

- Une toxicité plus faible de (M) vis-à-vis des cellules surexprimant la P-gp par rapport aux cellules qui l'expriment en moindre quantité, bien entendu pour une même lignée cellulaire. Pour ce faire des cellules tumorales (K562) et la lignée correspondante (K562/ADR) qui surexprime la P-gp ont été employées.

2.- Quels sont les effets toxiques induits par A β 42 dans les cellules neuronales?

Afin de contribuer à une meilleure connaissance des effets toxiques déclenchés par A β 42, nous nous sommes intéressés à étudier la variation des paramètres suivants : la concentration intracellulaire de chlorure et le potentiel de la membrane mitochondriale, en utilisant comme modèle la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y. Ce choix obéit à l'absence, dans la littérature, d'études approfondies sur la variation de ces deux paramètres, contrairement à l'abondante littérature existant sur le lien entre les variations des concentrations d'ions Ca²⁺ et la toxicité neuronale.

3.-L'efflux de la Pirarubicine par la P-gp peut-il être modulé par de nouvelles molécules synthétiques ?

Une partie complémentaire de cette thèse a été dédiée à l'étude de la capacité inhibitrice de différentes molécules sur le transport d'une anthracycline, la Pirarubicine (Pira), par la P-gp en utilisant comme modèle la lignée cellulaire K562/ADR, sur exprimant ce transporteur. Cette partie sera développée du point de vue théorique et expérimental dans un chapitre 7.



□

□

□

Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer : généralités et principaux acteurs moléculaires

1.1.- La maladie d'Alzheimer : généralités et aspects cliniques

De nos jours, l'espérance de vie progresse de plus en plus au niveau mondial. Cela peut constituer un triomphe des sociétés modernes mais signifie aussi l'apparition d'une série de problèmes et de changements, dont les maladies liées à l'âge. Parmi ces maladies, celles qui sont de la famille des pathologies neurodégénératives, constituent une partie importante de ces problèmes.

En 1906, le psychiatre bavarois Alois Alzheimer présenta, lors d'un congrès à Munich, les caractéristiques d'un syndrome étudié chez une femme âgée. Ces caractéristiques étaient :

- Perte progressive de la mémoire.
- Fonctions cognitives altérées.
- Altérations du comportement mises en évidence par la manifestation de la paranoïa et des hallucinations.
- Trouble progressive du langage (aphasie).

A l'heure actuelle, le regroupement de ces manifestations et d'autres au niveau histologique est connu sous le nom de maladie d'Alzheimer, et elle représente près de 60% des cas de maladies neurodégénératives (Selkoe, 2001 ; Niedowics *et al*, 2011) (Figure 1).

Aujourd'hui, plus de 35 millions de personnes sont touchées par cette maladie. Ce chiffre sera presque doublé au cours des 20 prochaines années : les estimations prévoient environ 66 millions en 2030 (Wimo *et al*, 2013).

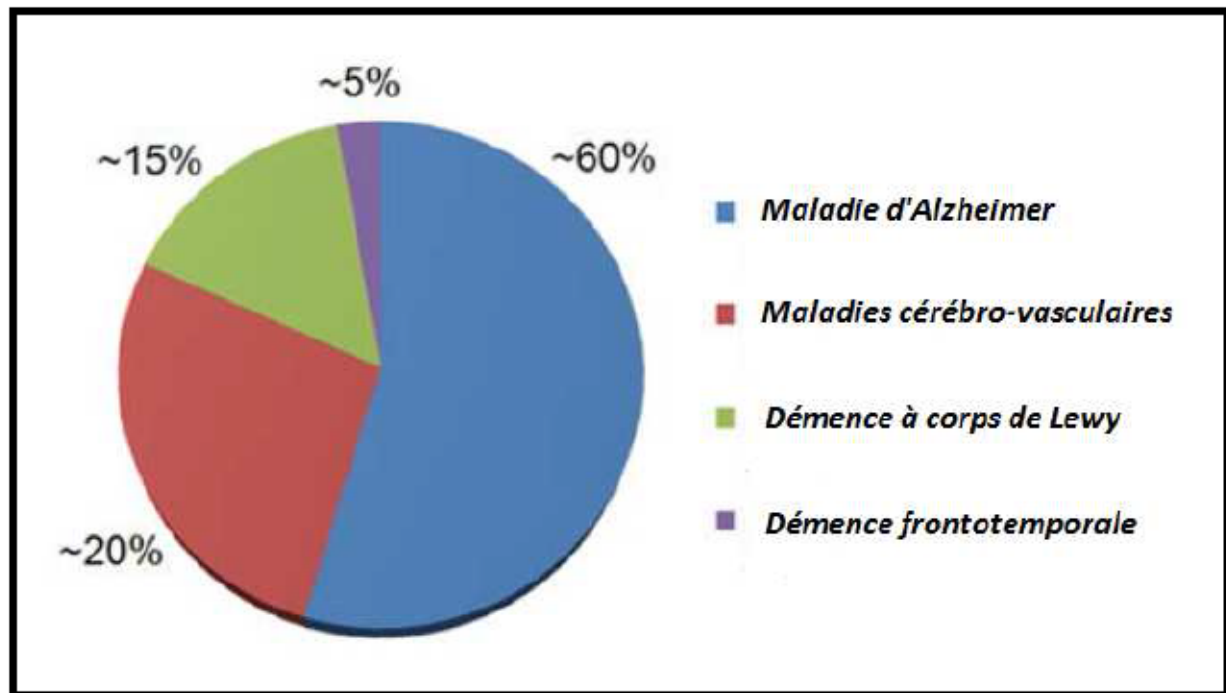


Figure 1 : Distribution des principales maladies neurodégénératives. D'après Niedowicz et al, 2011

L'organe concerné par la maladie d'Alzheimer est le cerveau. Plus spécifiquement, les altérations au cours de cette maladie affectent les neurones. Chez l'humain, le cerveau contient environ 10^{11} neurones. Ces neurones sont des cellules spécialisées capables de transmettre de l'information par l'intermédiaire de signaux électriques et chimiques. La plupart des neurones contient trois parties fondamentales : le corps cellulaire, l'axone et les dendrites (Figure 2a). La survie des neurones dépend de trois processus biologiques :

1. La communication cellulaire avec d'autres neurones.
2. Les réactions métaboliques afin d'assurer le bon fonctionnement.
3. La réparation des connexions nécessaires pour la communication inter-neurones et leur régénération pour assurer l'accomplissement des fonctions cérébrales telles que l'apprentissage et la mémoire.

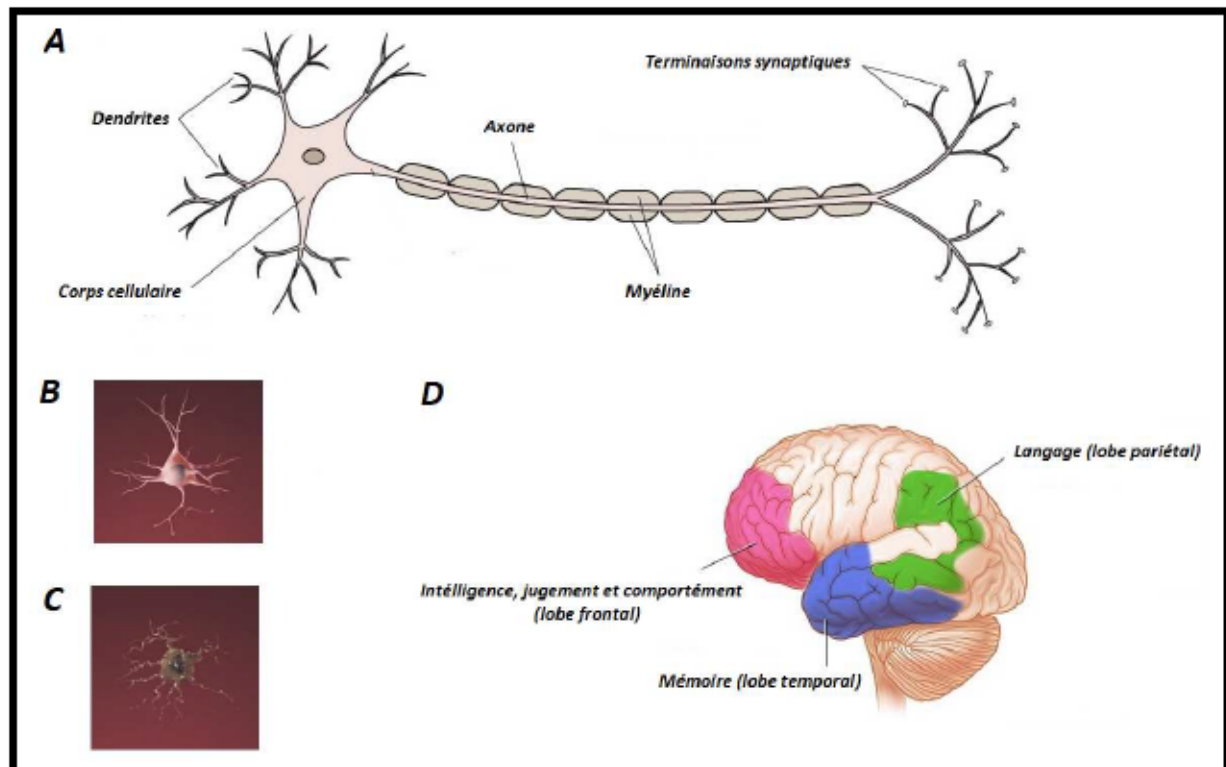


Figure 2. Un neurone est généralement composé de trois parties fondamentales : le corps cellulaire qui contient le noyau et les autres organites, l'axone entouré de myéline, une substance de nature lipidique protectrice et les dendrites (A). Lors de la maladie d'Alzheimer, la structure et le fonctionnement des neurones sont affectés finissant par la mort des cellules (B, neurone sain et C, neurone affecté par la maladie d'Alzheimer). La mort neuronale affecte certaines régions du cerveau associées au langage, à la mémoire et au comportement (D)

Lors de la maladie d'Alzheimer, les neurones sont endommagés au point qu'ils cessent de fonctionner et finalement meurent. Au début de la maladie, la destruction des neurones et de ses connections a lieu dans le cortex entorhinal et l'hippocampe cérébral, deux zones du cerveau associées à la mémoire. Dans les étapes tardives de la maladie, la mort neuronale s'étend aux régions du cortex responsables du langage, du comportement social et du raisonnement (Figure 2d), rendant, contrairement à un sujet sain, la personne incapable de percevoir le monde extérieur.

La maladie d'Alzheimer étant un désordre progressif, on distingue au niveau clinique les étapes suivantes (Sperling *et al*, 2011 ; Weintraub *et al*, 2012) :

1. **La phase préclinique** : les lésions commencent dans le cortex entorhinal et continue vers l'hippocampe, une région très proche de la première et qui intervient dans la mémoire à court et à long terme. Par conséquent, la perte de la mémoire s'avère comme le premier signe perceptible.
2. **La phase faible à modérée** : la perte de la mémoire s'aggrave et d'autres changements dans des habilités cognitives commencent à apparaître, tels que confusion sur la localisation de certains objets, anxiété, hallucinations, paranoïa, irritabilité, perte de la spontanéité et de l'initiative pour accomplir des tâches quotidiennes, problèmes pour reconnaître des amis et membres de la famille, premières difficultés avec la lecture, l'écriture et les mathématiques. Les signes histopathologiques caractéristiques de la maladie sont nombreux et le diagnostic clinique est surtout fait au cours de cette étape.
3. **La phase sévère** : l'atrophie cérébrale est étendue et le patient devient complètement dépendant des soins apportés par les autres. La perte du poids est manifeste, ainsi que les infections et le sommeil prolongé. La mort neuronale est assez importante. A cette étape, la personne passe la plupart du temps couchée et finalement meurt, le plus souvent suite à des complications respiratoires.

En liaison avec les manifestations cliniques mentionnées ci-dessus, il y a deux caractéristiques au niveau microscopique qui constituent les marqueurs histopathologiques de la maladie (Figure 3), (Selkoe, 2001 ; Cvetković-Dožić *et al*, 2001 ; Walsh and Selkoe, 2004 ; Avila *et al*, 2004 ; Perl, 2010) :

1. **Les plaques séniles ou plaques neuritiques** : il s'agit des structures complexes composées par des agrégats amorphes d'une protéine d'environ 4 kDa dans une conformation majoritairement de type feuillet β plissé appelée peptide amyloïde. Ces

agrégats sont détectés au niveau extracellulaire et parfois sont corrélés avec le dommage de l'axone et des dendrites des neurones.

2. **Les dégénérescences neurofibrillaires** : il s'agit d'inclusions fibreuses anormales qui occupent la plupart du cytoplasme perinucléaire (c'est-à-dire qu'elles sont intracellulaires) composées par une protéine nommée *Tau*, associée aux microtubules. L'utilisation des anticorps spécifiques a permis de montrer que cette protéine présente une hyper phosphorylation, altération qui est peut être à l'origine de son accumulation. Cette protéine est impliquée dans la stabilisation du cytosquelette neuronal. L'hyper phosphorylation de *Tau* est alors à l'origine de la déstabilisation du cytosquelette et par conséquent la perte de la forme du neurone et finalement **de** sa mort.

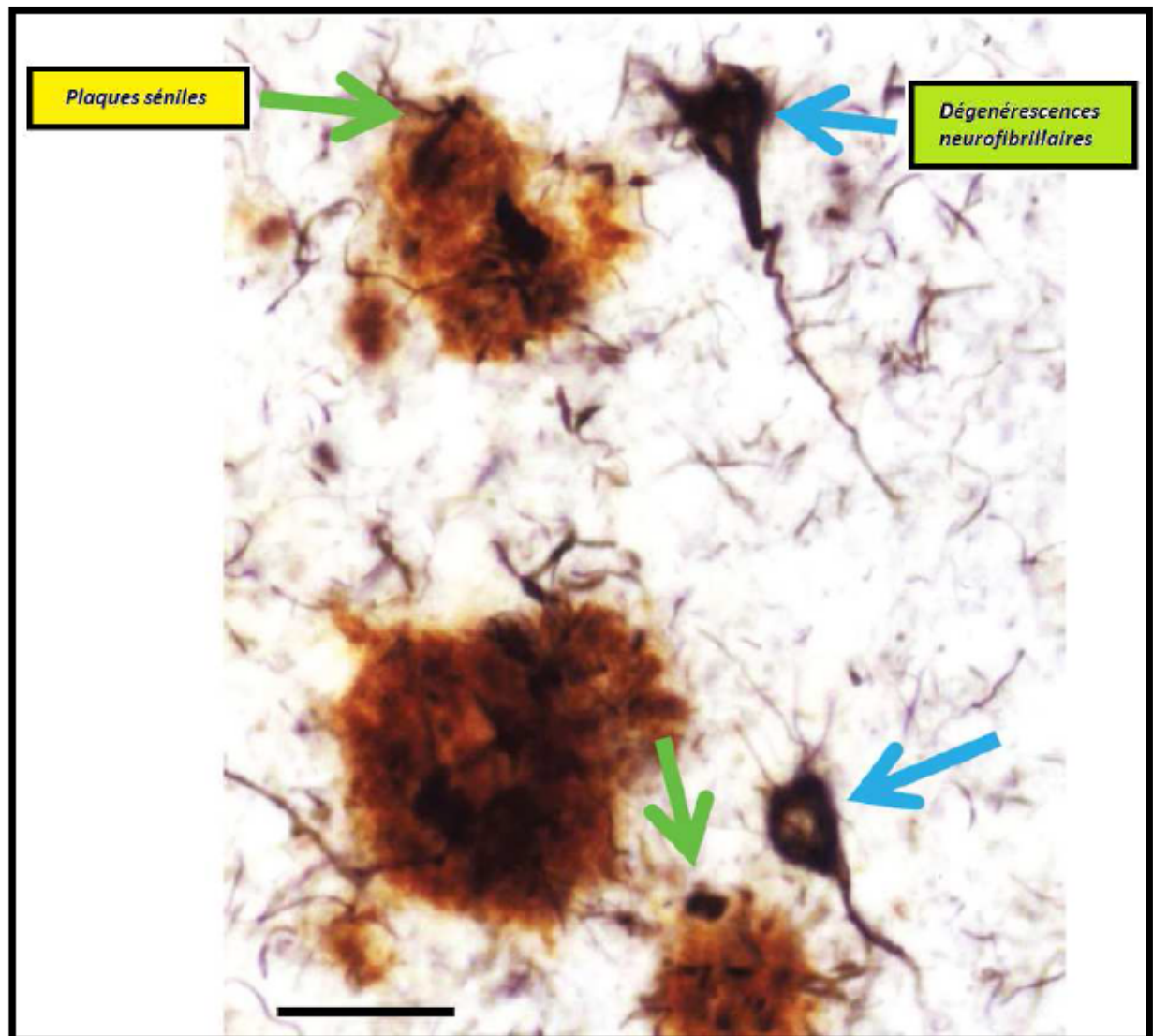


Figure 3 : Les lésions cérébrales caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. La barre représente 50 μ m. D'après Nelson et al, 2012

1.2.- Acteurs moléculaires à l'origine de la maladie d'Alzheimer

1.2.1.- La protéine précurseur du peptide amyloïde

La protéine précurseur du peptide amyloïde (APP pour *Amyloid precursor protein*) est une glycoprotéine transmembranaire (Figure 4) exprimée de façon ubiquitaire chez les mammifères, évolutivement conservée et dont les fonctions sont mal connues.

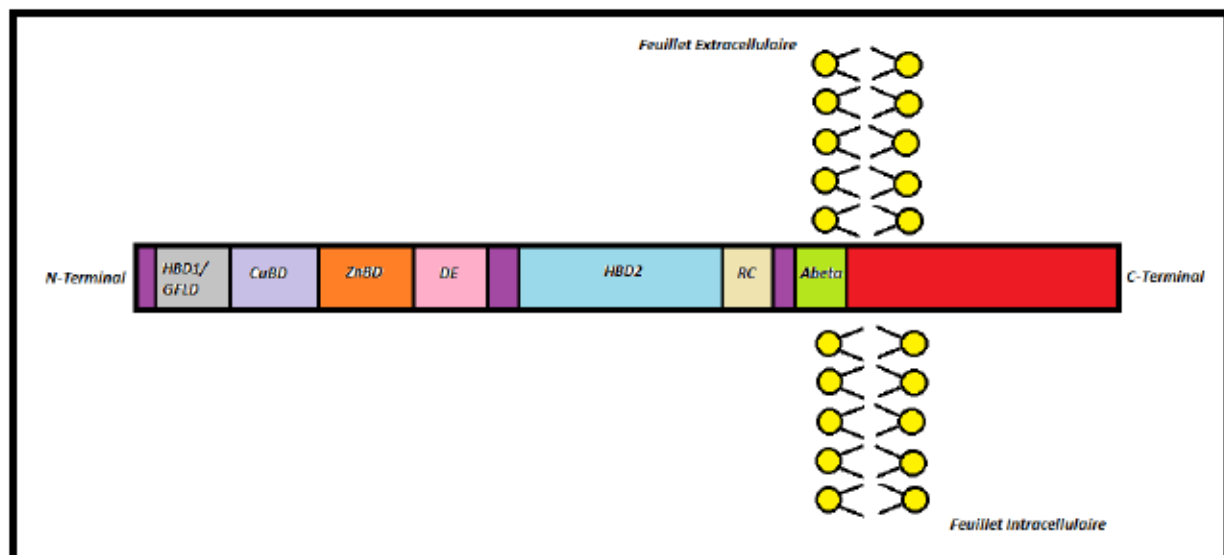


Figure 4: Structure de l'APP. Les domaines fonctionnels sont localisés majoritairement au niveau de la région extracellulaire de la protéine et incluent notamment des domaines qui agissent comme facteur de la croissance cellulaire et d'union à l'héparine (HBD1/GFLD en gris clair et HBD2 en bleu clair), des domaines de complexation aux métaux cuivre et zinc (CuBD en violet clair et ZnBD en orange respectivement) et un domaine responsable de la génération des peptides amyloïdes, responsable de la maladie d'Alzheimer (couleur vert) (Modifié d'après Lazarov and Demars, 2012)

Cette protéine appartient à la famille des protéines membranaires de type I (Zheng et Koo, 2011 ; Lazarov and Demars, 2012 ; O'Brien and Wong, 2011). Tous les membres de cette famille possèdent des domaines extracellulaires assez longs tandis que le domaine intracellulaire est de petite taille.

Le *splicing* alternatif de l'ARN messenger de l'APP produit 8 isoformes qui diffèrent de par leur nombre d'acides aminés : 695, 751 et 770 ; la forme de 695 acides aminés est exprimée principalement au sein du système nerveux central (SNC) (Bayer *et al*, 1999). L'APP est aussi la cible des modifications qui ont lieu après la traduction de l'ARN messenger, telles que la glycosylation, la phosphorylation et l'addition des groupes sulfate aux résidus de tyrosine (Zheng and Koo, 2011).

1.2.2.- Les sécrétases

A) *L' α -sécrétase* est une enzyme transmembranaire ayant une activité endoprotéase de type métallo protéinase qui est censée participer au clivage de l'APP (Sangram, 1992). Les enzymes possédant cette activité présentent un domaine de type « *disintegrin* », responsable de l'interaction de l'enzyme avec la matrice extracellulaire ainsi qu'au clivage de protéines membranaires. Les protéines connues possédant cette activité appartiennent à la famille ADAM (pour *A Disintegrin and A Metalloprotease*) (Zhang *et al*, 2011).

B) *La β -sécrétase* est une enzyme transmembranaire localisée au niveau des neurones qui a une activité aspartyl-protéinase. Elle est appelée BACE1 (pour *β -site APP cleaving enzyme*) (Zheng and Koo, 2011). Elle participe à la première étape de la génération du peptide amyloïde.

C) *La γ -sécrétase* est une enzyme issue d'un complexe constitué de 4 protéines intégrales de membrane : la préséniline, la nicastrine, l'Aph-1 (pour *Anterior pharynx defective 1*) et la Pen-2 (pour *Presenilin enhancer 2*). Elle présente une activité de type aspartyl protéinase et participe à la deuxième étape du clivage de l'APP (Farmery *et al*, 2003 ; Wolfe, 2006).

1.2.3.- Les peptides amyloïdes ($A\beta$)

Ils résultent d'un processus de clivage enzymatique séquentiel mené par les sécrétases sur l'APP. Ce processus peut avoir lieu selon deux voies différentes :

Voie non amyloïdogénique : l'APP est d'abord substrat de l' α -sécrétase au niveau de la liaison peptidique entre les résidus d'acides aminés Lysine (Lys) et Leucine (Leu) situés dans les positions 16 et 17 du domaine $A\beta$, produisant un métabolite soluble appelé sAPP α .

Ce fragment contient la plupart des domaines fonctionnels de la protéine. Ce premier clivage exclue la possibilité de génération des peptides A β « intacts » et donc pathogènes.

Le fragment qui reste attaché à la membrane, spécifiquement la partie du domaine A β , est pris en charge par l'activité de la γ -sécrétase générant un fragment extracellulaire tronqué d'A β de 3 kDa appelé p3 et aussi le peptide cytoplasmique AICD (Figure 5).

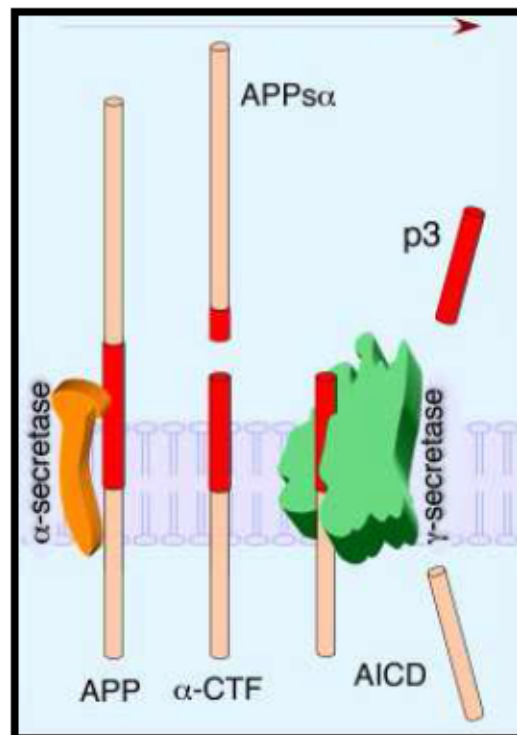


Figure 5: Voie non amyloïdogénique du métabolisme de l'APP. Cette voie est caractérisée par le non génération des peptides A β fonctionnels. Voir description dans le texte (figure d'après Thinakaran and Koo, 2008)

Voie amyloïdogénique : l'APP est d'abord substrat de la β -sécrétase au niveau de la liaison peptidique entre les résidus d'acides aminés Méthionine (Met) et Aspartate (Asp) situés dans les positions 671 et 672, produisant le métabolite sAPP β . La différence entre sAPP β et sAPP α est que sAPP β n'inclue aucune partie du domaine A β , laissant la possibilité de génération des peptides amyloïdes pathogènes.

Le fragment de 99 acides aminés (appelé CTF β) qui reste attaché à la membrane est ensuite soumis à la γ -sécrétase. Cette enzyme étant peu sélective dans les sites de clivage, amène à la production des peptides amyloïdes A β de différentes tailles, qui varient entre 38 et 43 acides aminés ainsi que le peptide cytoplasmique AICD (Murphy and LeVine, 2010 ; Thinakaran and Koo, 2008) (Figure 6).

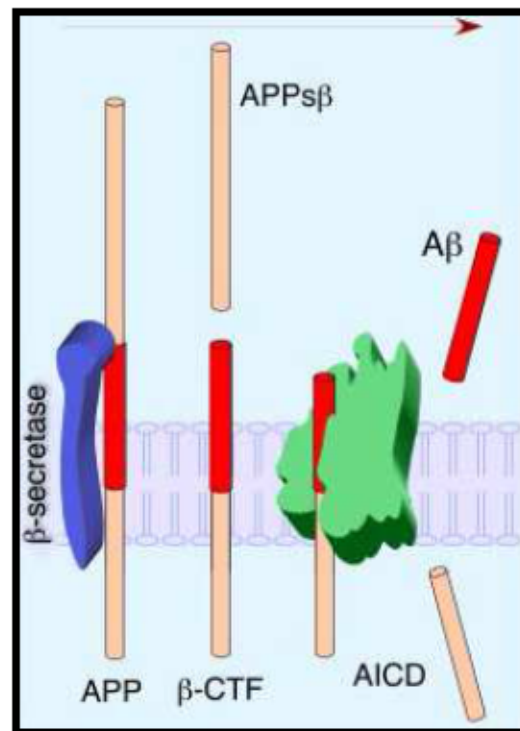


Figure 6: Voie amyloïdogénique de la production des peptides amyloïdes. Voir description dans le texte (figure d'après Thinakaran and Koo, 2008)

Parmi toutes les variétés de peptides amyloïdes générées par l'action de la γ sécrétase, il y en a deux particulièrement abondantes : la forme de 40 acides aminés (A β 40) qui constitue à peu près 80-90% des produits totaux et la forme de 42 acides aminés (A β 42) qui représente 5-10% du total. De ces deux peptides, la forme la plus longue (A β 42) est la plus

hydrophobe et par conséquent celle qui a tendance à former des fibrilles qui se déposent au niveau cérébral (Selkoe, 2001).

La partie de l'APP à l'origine des peptides A β , se trouve dans la membrane plasmique. Il a été proposé que la seule production de ces peptides soit un événement exclusivement pathologique. Cependant, ce n'est qu'au début des années 90 que surgissent des travaux montrant que la libération de A β avait aussi lieu dans des conditions cellulaires normales et le peptide commence à être détecté dans plusieurs types cellulaires ainsi que dans le plasma et dans le fluide cérébrospinal des individus non atteints par la maladie d'Alzheimer (Busciglio *et al*, 1993 ; Seubert *et al*, 1992).

1.3.- Les peptides A β sont-ils nécessaires pour la fonction neuronale ?

Malgré les résultats montrant la production de A β dans des conditions cellulaires normales, son rôle physiologique au sein du cerveau reste, à ce jour, méconnu. Cependant, un certain nombre de propositions, issues de différents travaux de recherche, ont été faites :

- Les peptides A β pourraient être des régulateurs physiologiques de la fonction des canaux ioniques dans les neurones, notamment ceux de K⁺ (Yu, 2003). L'activité de plusieurs types de canaux potassiques est corrélée avec l'excitabilité, l'excitotoxicité causée par la libération du glutamate et l'augmentation de la conductance du K⁺ liée à l'apoptose. Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, il a été trouvé qu'A β peut entraîner la conductance du potassium dans les neurones et les astrocytes, conduisant à la mort cellulaire.

- D'autres expériences suggèrent que A β joue un rôle dans le contrôle de l'activité synaptique via un *feedback* négatif (Figure 7), c'est-à-dire que l'activité synaptique produit augmentation de l'activité de l' β -sécrétase sur l'APP, augmentant la production de A β , ce

qui diminue l'activité synaptique (Esteban, 2004). La régulation de l'activité synaptique est importante car si celle-ci est excessive, il y a excytotoxicité et par voie de conséquence mort neuronale.

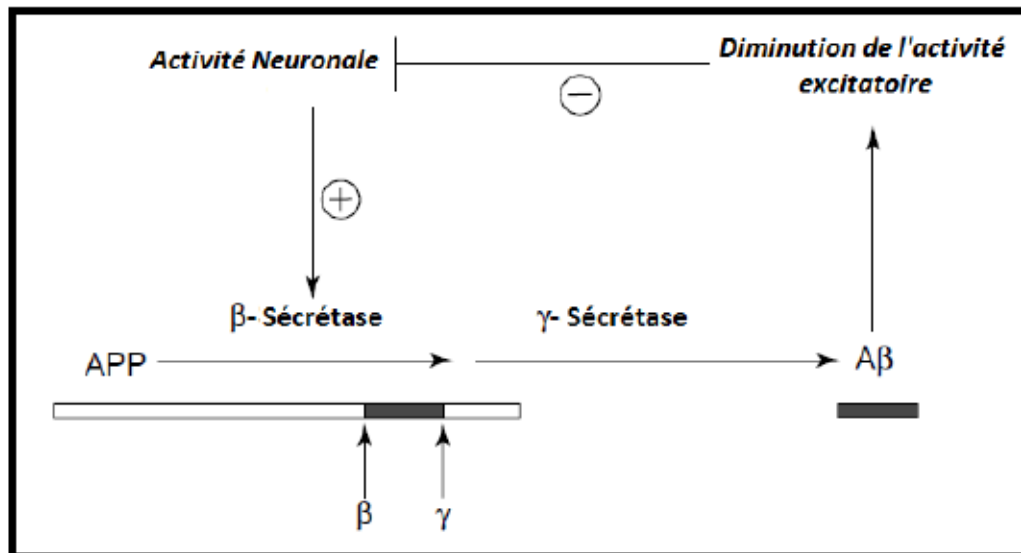


Figure 7. Mécanisme proposé pour le contrôle de l'activité synaptique par Aβ (d'après Esteban, 2004)

Concernant l'influence de Aβ sur la survie neuronale, Plant *et al* (2003) ont montré qu'une inhibition de l'activité des β et γ sécrétases entraînait la mort neuronale. Cette mort peut-être due au non production de Aβ. Il est intéressant de remarquer que cet effet est annulé par addition de la forme Aβ40 tandis que la forme Aβ42 n'a pas d'effet significatif.

Ces travaux et bien d'autres essaient d'expliquer l'importance de la production des peptides amyloïdes chez les individus sains. Pourtant, le problème suivant reste à résoudre : quels facteurs sont à l'origine de son accumulation, cause apparente de la maladie d'Alzheimer et, pourquoi son accumulation est toxique ?

□

□

□

□

Chapitre 2 : L'agrégation du peptide amyloïde à l'origine de la maladie d'Alzheimer

2.1.- Le phénomène d'agrégation des peptides amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer

Comme il est décrit dans la section 1.2, les peptides A β sont les produits du clivage de l'APP par les α , β et γ sécrétases. L'activité protéolytique de la γ -sécrétase en différentes positions du domaine A β libère différents fragments composés de 36-43 acides aminés, dont les plus nombreux sont A β 40 et A β 42. Les séquences de ces deux peptides sont représentées dans la figure 8.

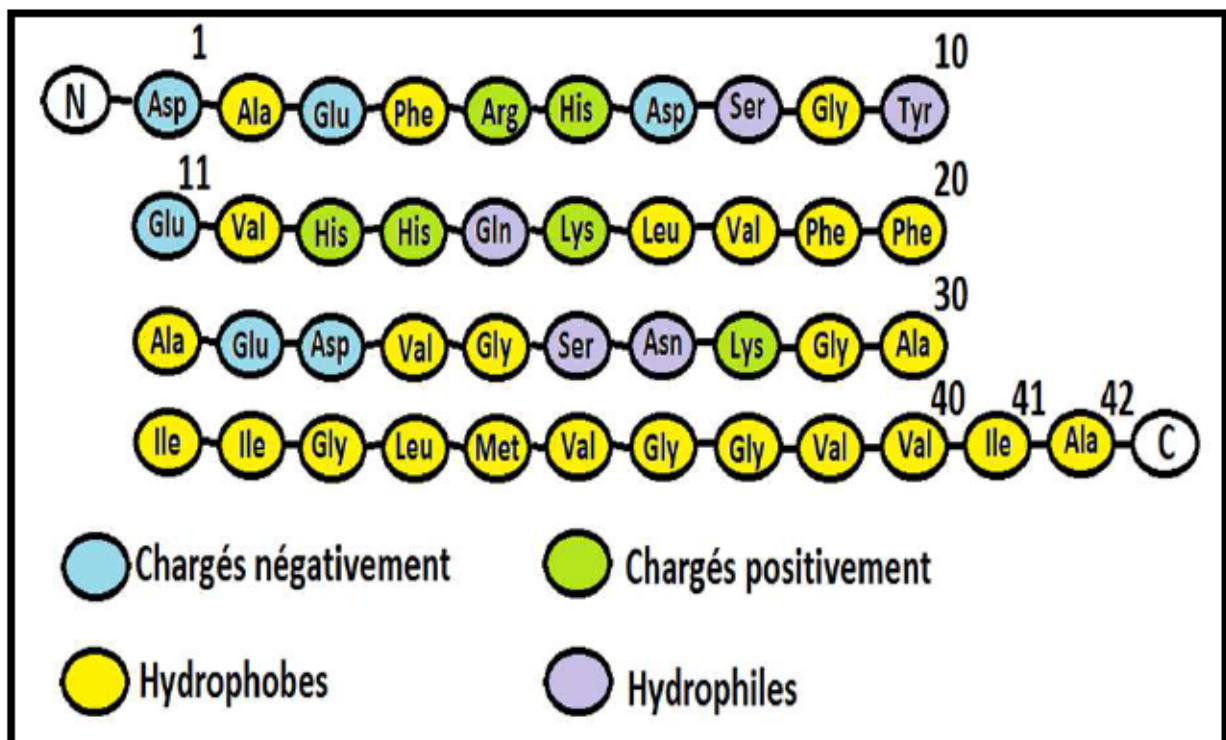


Figure 8: Séquence primaire des peptides amyloïdes. La figure fait référence aux formes de 40 et 42 acides aminés

La présence, dans les séquences primaires des peptides, de résidus d'acides aminés hydrophobes (23 dans la forme A β 40 et 25 dans la forme A β 42), est la raison pour laquelle A β montre une tendance à former des agrégats dans un milieu aqueux et explique, en partie, la présence de ces agrégats lors de la maladie d'Alzheimer. L'importance de la séquence a été mise en évidence par différentes études et a conduit à l'identification d'un centre hydrophobe

comprenant les résidus 17-21, ainsi qu'un rôle majeur du domaine C-terminal dans la formation des agrégats (Di Carlo, 2010). La présence de deux résidus hydrophobes supplémentaires, dans la forme A β 42 par rapport à la forme A β 40, explique pourquoi celle-ci forme moins facilement des agrégats que A β 42 (Figure 8).

D'une manière générale, l'agrégation peut être considérée comme étant due à l'interaction entre protéines, initialement dépliées, jusqu'à la formation de conglomerats, souvent amorphes, au niveau intra ou extracellulaire. Dans la plupart des cas, ces agrégats sont toxiques. Bien que la disposition des protéines qui forment ces agrégats soit désordonnée, la conformation de chacune d'entre elles est souvent essentiellement en feuillet plissé β .

Dans le but de déterminer ce qui, de façon ultime, conduit à la formation de plaques, marqueurs histopathologiques de la maladie d'Alzheimer, l'agrégation des peptides amyloïdes a été, depuis plusieurs années, l'objet de nombreux travaux de recherche. Cette connaissance du processus d'agrégation s'avère très importante pour le développement de stratégies efficaces destinées à prévenir ou/et à traiter la maladie.

Les études *in vitro* de l'agrégation utilisant des formes synthétiques de A β suggèrent que, en solution, les peptides amyloïdes sont d'abord déstructurés puis acquièrent au cours du temps des conformations dans lesquelles prédomine le feuillet β . (Jan *et al*, 2010).

La transition d'une forme, initialement déstructurée, à des formes agrégées avec une conformation définie, inclut des « états » intermédiaires de disposition spatiale et de poids moléculaire caractéristiques de chacune d'entre elles. Certains de ces intermédiaires sont caractérisés par :

- La prédominance de la structure secondaire de type feuillet plissé β (Walsh *et al*, 1999).

- La forte interaction de différentes molécules telles que le Rouge de Congo et la Thioflavine T (ThT) avec A β , par rapport aux fibrilles matures qu'on trouve dans les plaques séniles (Jan *et al*, 2008 ; Williams *et al*, 2003).
- L'existence d'un équilibre entre la forme monomérique de A β et des formes intermédiaires (Ketherpal *et al*, 2003).

D'une façon générale, dans certaines conditions favorables, le peptide A β structuré peut devenir monomérique (Figure 9). Ces monomères servent à la fois pour la formation des formes oligomériques de bas et haut poids moléculaire qui seront le matériel de base pour la constitution des protofibrilles et finalement des fibrilles matures (Stains *et al*, 2007 ; Jan *et al*, 2010).

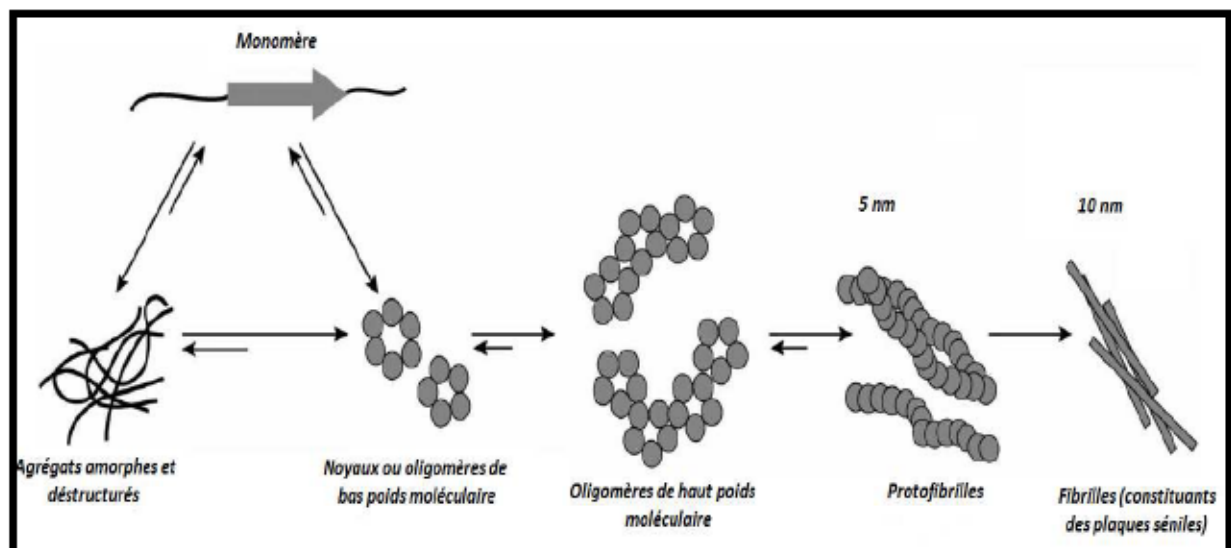


Figure 9: Voie générale d'agrégation du peptide amyloïde A β (d'après Stains *et al*, 2007)

La formation des fibrilles à partir de monomères constitue un cas de polymérisation dépendant de la nucléation (Roychadhuri *et al*, 2009), c'est-à-dire, nécessitant une étape de nucléation durant laquelle les monomères forment une unité de base pour la constitution de la protofibrille. L'unité de base est souvent un pentamère ou un hexamère. Ensuite, ces unités se

rassemblent pour former la protofibrille qui connaît une rapide élongation. Finalement, cette dernière constituera les fibres matures qui vont se déposer pour former les plaques amyloïdes.

Les différentes méthodes de préparation des formes synthétiques du peptide amyloïde, ainsi que les techniques employées pour la détection des intermédiaires, ont donné lieu à une nomenclature assez large et confuse destinée à décrire et caractériser chacune des espèces obtenues. Cette diversité d'intermédiaires suscite des questions quant à son rôle dans la maladie d'Alzheimer, au-delà de sa simple participation dans une voie d'agrégation. Autrement dit, il est intéressant de déterminer si ces espèces ont un effet nocif au niveau neuronal.

Dans ce contexte, la suggestion, peut être la plus importante, est la suivante: les fibrilles sont-elles les formes responsables de la dégénérescence neuronale (Hardy and Higgins, 1992 ; Haass and Selkoe, 2007). Cette hypothèse est connue comme l'**Hypothèse de la cascade β amyloïde** (Figure 10a) et propose qu'une augmentation dans la production et/ou une diminution dans l'élimination des peptides A β soit l'événement déclencheur de la maladie d'Alzheimer. Une augmentation dans la production d'A β 40 et A β 42 est à l'origine de son accumulation sous forme d'agrégats et finalement de la formation des plaques insolubles.

Actuellement, l'essentiel de cette hypothèse est acceptée mais, étant donné que les plaques amyloïdes ont été également trouvées chez des individus sains, la tendance est de penser que celles-ci ne sont pas nécessairement corrélées avec les changements observés dans la maladie (Pimplikar, 2009). De plus, il a été proposé que ces plaques aient un rôle protecteur pour les neurones (Caughey and Lansbury, 2003), effet qui a été observé chez des souris chez lesquelles la formation des fibrilles qui constituent les plaques a été accélérée (Cheng *et al*, 2007). Ces observations laissent un rôle peut être secondaire aux peptides amyloïdes et ont

contribué à reformuler l'hypothèse de la cascade amyloïde (Pimplikar, 2009 ; Armstrong 2011) (Figure 10b).

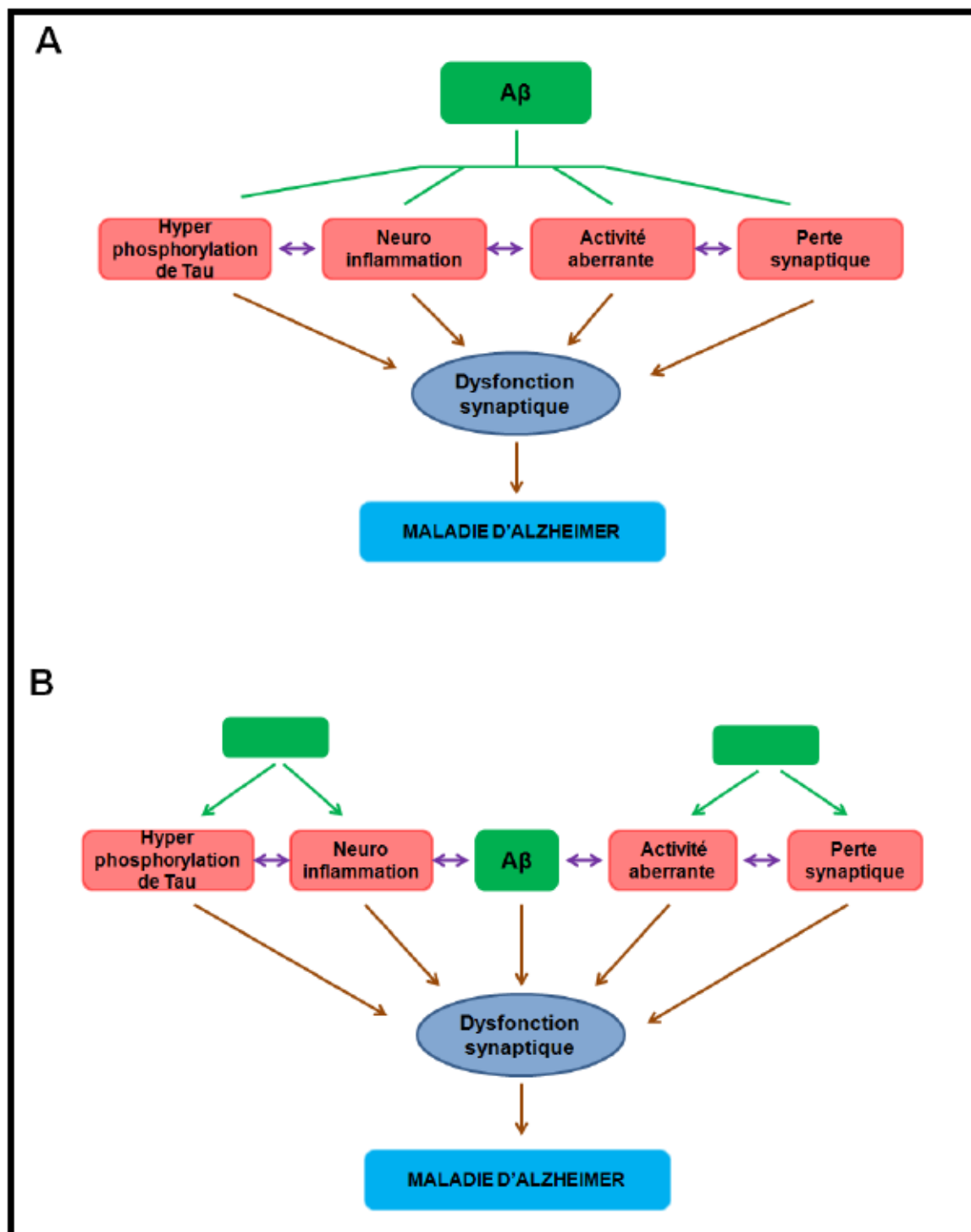


Figure 10. A) L'hypothèse de la cascade amyloïde propose que le peptide A β est la cause primaire de la maladie d'Alzheimer, occupant la partie la plus haute de la cascade (ovale vert). B) Une vision modifiée, proposée récemment, suggère qu'il y a aussi des éléments déclencheurs de la maladie non liés au peptide amyloïde (rectangles verts). D'après Pimplikar (2009)

La question se pose donc : quels sont les intermédiaires existants avant la formation des fibrilles ? Malgré la connaissance du processus de polymérisation dépendant de la nucléation qui donne lieu aux fibrilles *in vitro* (proposé dans la Figure 9), on ne sait pas encore si cette voie est identique *in vivo* et surtout s'il s'agit d'une seule voie.

Afin de mieux connaître ce mécanisme, les approximations utilisées par les différentes équipes de recherche incluent les études d'agrégation des peptides synthétiques et l'isolement des oligomères à partir des extraits cérébraux ainsi que des tissus en culture. Les résultats de ces travaux suggèrent d'emblée que l'assemblage de A β est complexe. Par ailleurs, *in vitro*, les résultats sont très sensibles aux conditions expérimentales utilisées, laissant l'interprétation des résultats assez ambiguë. Par exemple, les résultats obtenus vont dépendre de facteurs tels que la méthode de synthèse employée par l'entreprise qui commercialise le peptide, la série de production à laquelle celui-ci appartient, ainsi que la méthode de solubilisation employée par les différentes équipes de recherche. Celle-ci inclut souvent l'utilisation des solvants organiques tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'hexafluorure d'isopropanol (HFIP) et le trifluoroéthanol (TFE) pour l'obtention des formes monomériques de A β ; et, dans certains cas, des détergents en solution aqueuse pour déclencher le processus d'agrégation. Ce processus dépend également de la concentration du peptide utilisé et du pH du milieu (Yamamoto *et al*, 2004 ; Zhao *et al*, 2012 ; Khan *et al*, 2012 ; Dahlgren *et al*, 2002 ; Rangachari *et al*, 2007 ; Stine *et al*, 2003 ; Matsuzaki, 2007 ; Ryan *et al*, 2010).

Ainsi, certaines équipes ont observé, suite aux traitements des peptides synthétiques avec des solvants organiques, la formation d'intermédiaires oligomériques solubles. Ces intermédiaires, appelés Ligands Dérivés Diffusibles de A β (ADDLs, pour *A β derived diffusible ligands*), sont composés d'environ 12 monomères (~ 48 kDa) ou plus (Deshpande *et al*, 2006 ; Klein, 2002). Les ADDLs sont toxiques sur des cellules neuronales humaines causant la mort cellulaire.

Une forme particulière des oligomères de 12 unités a été trouvée en présence des détergents tels que le SDS dans le milieu de solubilisation, appelées oligomères stables dans le SDS (Rangachari *et al*, 2007 ; Ryan *et al*, 2010). Il est intéressant de noter que ce type d'oligomères ne forment pas de fibrilles (Rangachari *et al*, 2007) mais qu'ils sont cependant, toxiques pour les cellules (Ryan *et al*, 2010).

L'utilisation de molécules capables d'avoir un effet bloquant ou inhibiteur de l'agrégation des peptides A β a contribué à suggérer que les voies de formation des oligomères et des fibrilles sont différentes puisque la présence des premiers n'implique pas la formation des derniers. Dans ce sens, certaines molécules ont été classées en trois catégories : i) les molécules capables **d'inhiber l'oligomérisation** mais qui n'ont pas d'effet sur la formation de fibrilles (ex : azure C et curcumine), ii) les molécules capables **d'inhiber la formation des fibrilles** mais non l'oligomérisation (ex : le flavonoïde apigénine) et iii) les molécules capables **d'inhiber les deux voies** (ex : le rouge de phénol). La caractéristique commune de ces molécules est la présence de noyaux aromatiques (Necula *et al*, 2007 ; Stains *et al*, 2007) (Figure 11).

D'autres oligomères, de bas poids moléculaire (LMW oligomers, pour *Low Molecular Weight*) et de haut poids moléculaire tels que les protofibrilles ont été aussi identifiés et trouvés toxiques au niveau cellulaire (Stine *et al*, 2003 ; Dahlgren *et al*, 2002 ; Wu *et al*, 2010 ; Walsh *et al*, 1999) (Tableau I).

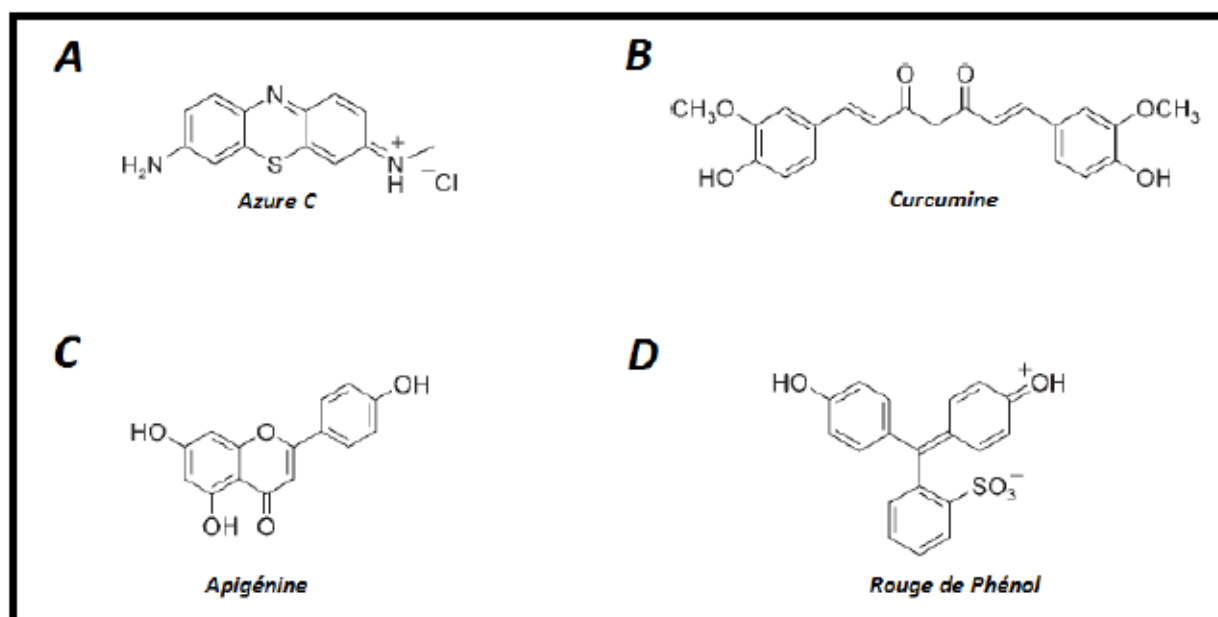


Figure 11. Exemples de molécules ayant un effet inhibiteur sur les voies d'agrégation des peptides A β

Tableau I. Petit glossaire des intermédiaires de l'agrégation de A β

Nom	Description
<i>Ligands diffusibles de Aβ (ADDLs)</i>	Intermédiaires globulaires de 3-6 nm de diamètre, aussi appelés globulomères. Sont constitués de 10 à 12 monomères de A β
<i>Oligomères stables dans le SDS</i>	Oligomères ayant une forte stabilité dans un milieu contenant du SDS
<i>Oligomères de bas poids moléculaire</i>	Oligomères d'environ 8 unités de A β en équilibre avec les formes monomériques
<i>Protofibrilles</i>	Intermédiaires riches en structure de type feuillet plissé β , qui disparaissent avec la formation des fibrilles matures et qui interagissent avec le rouge de Congo et la Thioflavine T
<i>Fibrilles</i>	Structure de type filamenteuse, composée de 2 à 6 unités de protofibrilles. Elles constitueront finalement les plaques amyloïdes.

Tous ces travaux montrent, non seulement que des espèces autres que les fibrilles peuvent jouer un rôle important dans le développement de la maladie d'Alzheimer mais aussi qu'elles peuvent être générées par différentes voies (Figure 12).

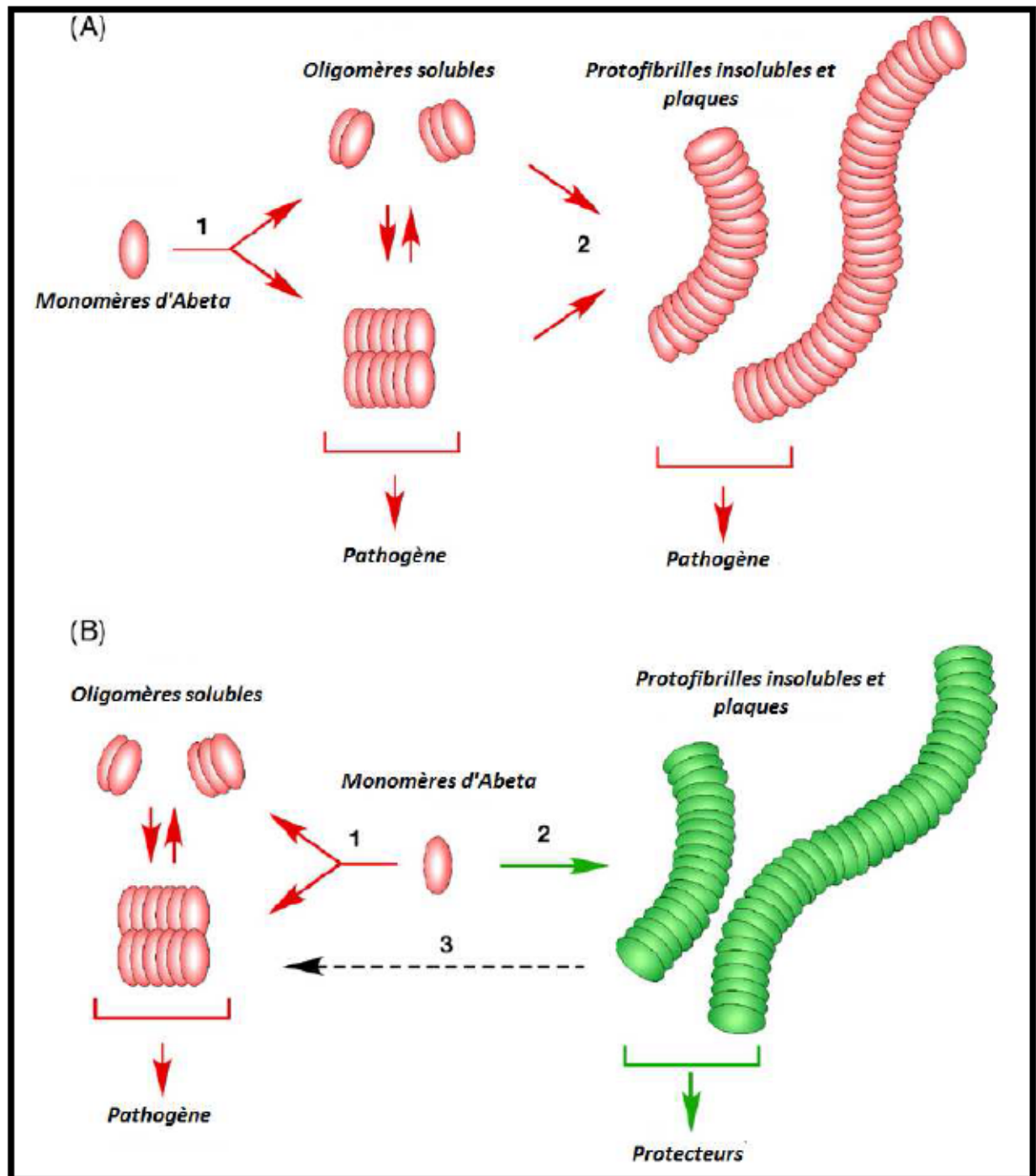


Figure 12. Voies possibles d'oligomérisation de Aβ in vivo à partir des données in vitro. A) Les monomères forment des oligomères de bas poids moléculaire (1) qui vont s'agréger pour former les protofibrilles, les fibrilles et finalement les plaques (2). Dans ce cas, toutes les espèces sont considérées comme toxiques. B) Les monomères forment des oligomères solubles (ADDLs) (1) qui sont toxiques ou forment des protofibrilles et des plaques (2). Ces dernières pourraient être protectrices (D'après Pimplikar, 2009)

□

□

□

Chapitre 3: Effets toxiques du peptide amyloïde au niveau neural

3.1.- Mécanisme de toxicité du peptide amyloïde dans les cellules

3.1.1. Altérations au niveau de la membrane plasmique

La nature plutôt hydrophobe des peptides amyloïdes, conférée par la présence de plusieurs résidus d'acides aminés associés à ce caractère, les prédispose à interagir avec les membranes biologiques, y compris celles des organites, de nature essentiellement lipidique (Verdier *et al*, 2004). Cette interaction A β -membrane peut entraîner un ou plusieurs mécanismes de toxicité :

1. Les lipides des membranes tels que les phospholipides, le cholestérol et les gangliosides (Avdulov *et al*, 1997 ; Yanagisawa, 2007) induisent l'agrégation des peptides A β par l'intermédiaire de la promotion du changement de conformation de A β . Le processus de formation des agrégats est censé se produire dans des zones de la membrane enrichies en clusters de gangliosides, tels que le Ganglioside M1 (GM1), appelés couramment *lipid rafts*, dont la formation est facilitée par la présence de cholestérol (Figure 13) (Malchiodi-Albedi *et al*, 2011 ; Yamamoto *et al*, 2007 ; Yanagisawa, 2007 ; Sakono and Sako, 2010). Ces agrégats de A β modifient la fluidité des membranes (Kremer *et al*, 2000), caractéristique importante pour le bon fonctionnement des protéines qui se trouvent insérées dans ces membranes. Ils peuvent aussi se lier à des nombreux récepteurs (Sakono and Zako, 2010) (Figure 14).
2. Le peptide A β peut aussi s'insérer dans les membranes, entraînant une perturbation de sa structure. Cette insertion est contrôlée par la relation cholestérol-phospholipides membranaires en relation avec la très grande affinité de A β pour le cholestérol (Verdier *et al*, 2004).

3. A la suite à leur insertion dans les membranes, les formes agrégées de A β , telles que les oligomères, peuvent promouvoir la libération de lipides membranaires conduisant à la perte de la fonction neuronale via le déséquilibre homéostatique de ces lipides (Michikawa *et al*, 2001).
4. Une autre conséquence de l'insertion membranaire de A β est la formation de canaux ioniques de taille et sélectivité variable (Arispe *et al*, 1993a,b ; Kagan *et al*, 2002, Arispe *et al*, 2007 ; Sepulveda *et al*, 2010 ; Demuro *et al*, 2011). Il s'agit des canaux indépendants du voltage et pauvrement sélectifs envers les ions qu'on trouve dans des conditions physiologiques, permettant de cette façon le passage des ions Ca²⁺, Na⁺, K⁺, Cs⁺ et Li⁺. L'entrée des ions Ca²⁺ a été largement étudiée ; il a été montré que l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ entraînait la mort cellulaire, en raison de son rôle important dans de nombreuses voies de signalisation. Cette augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca²⁺ peut aussi avoir lieu par le biais de la possible interaction de A β avec d'autres canaux ioniques présents dans la membrane, modifiant ainsi leur activité (Kim and Rhim, 2011). D'autre part, le passage des ions à travers ces canaux contribue au dérèglement des potentiels de membrane nécessaires pour la génération des potentiels d'action (Crouch *et al*, 2008).

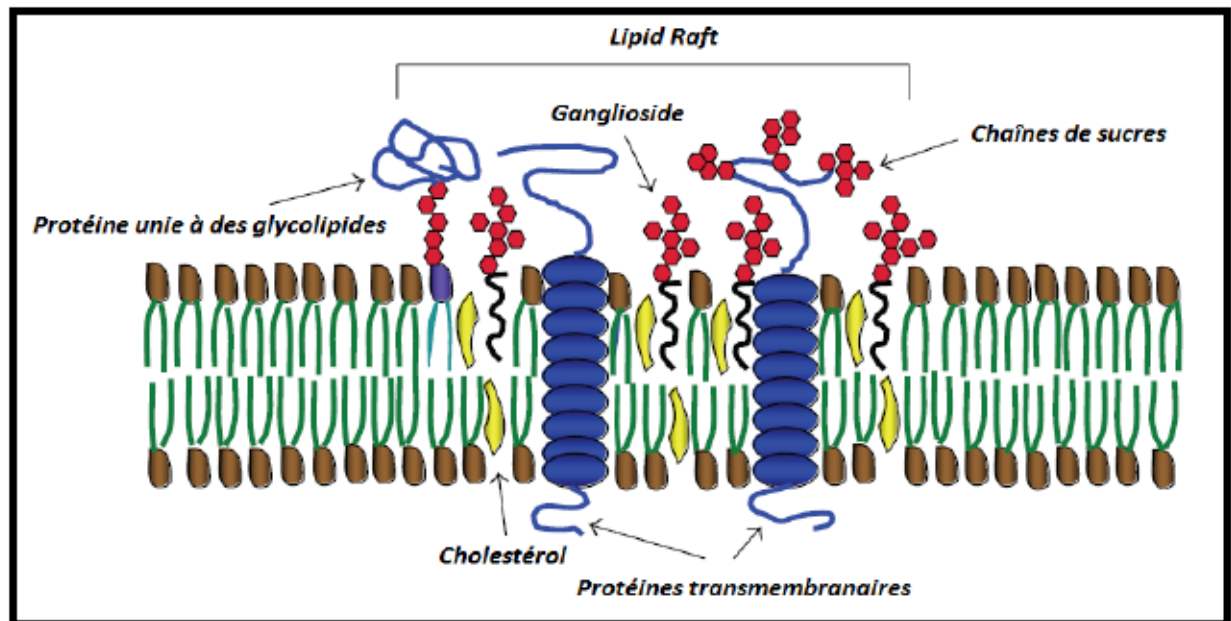


Figure 13. « Raft » lipidique typique des membranes cellulaires : structures enrichies principalement en gangliosides et cholestérol (D'après Malchiodi-Albedi et al, 2011)

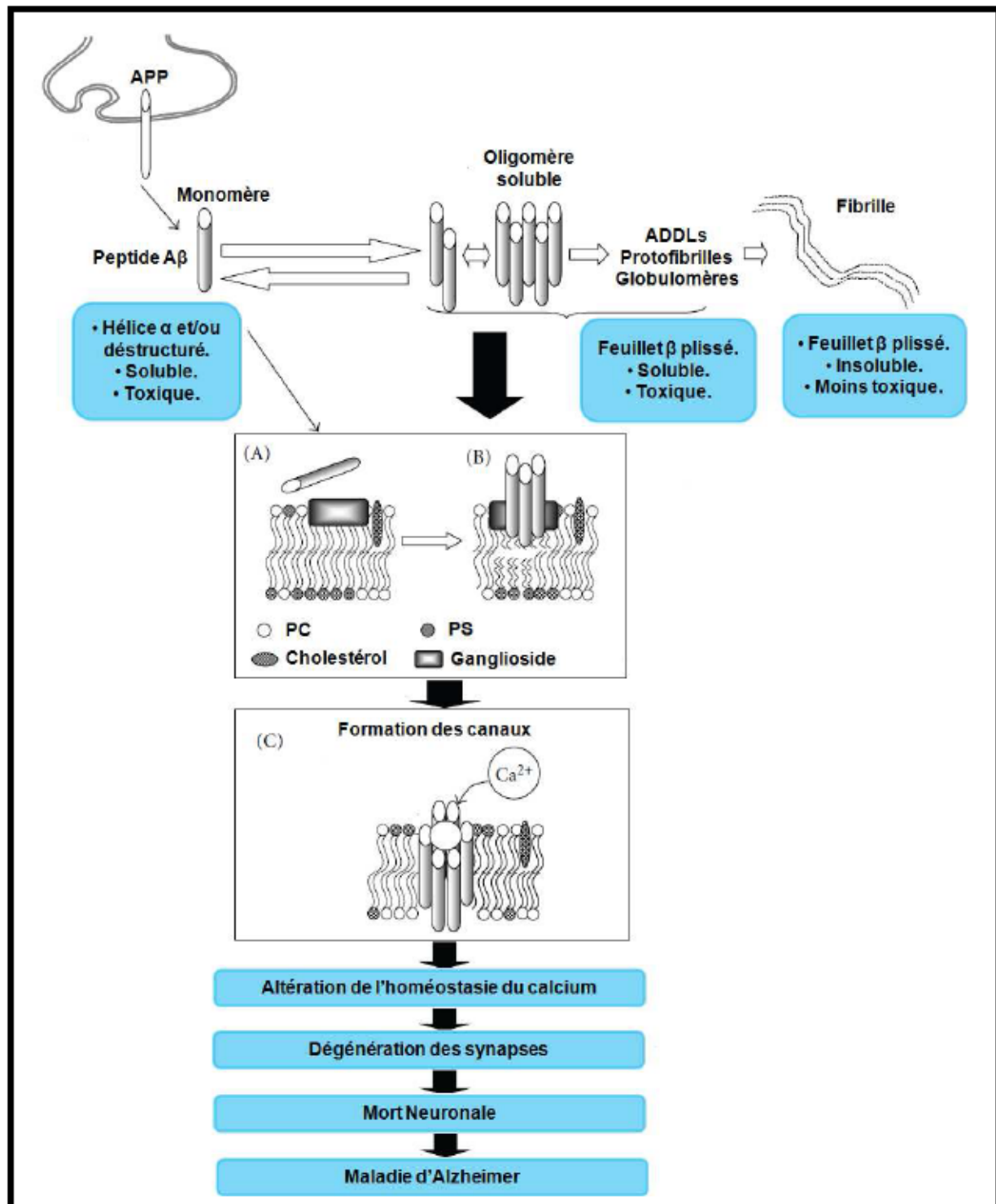


Figure 14. Mécanismes possibles expliquant la toxicité de Aβ. L'interaction des monomères de Aβ avec des composants membranaires tels que les gangliosides ou d'autres lipides, induisent son oligomérisation. Ces oligomères peuvent former de pores (canaux) qui altèrent le passage des ions parmi lesquels les ions Ca^{2+} . Dans la figure : PC (phosphatidyl choline), PS (phosphatidyl serine) (D'après Kawahara et al, 2011)

3.2.2. Dysfonctionnement de la mitochondrie et stress oxydant

La mitochondrie est un organe dont la fonction est essentielle pour l'accomplissement de plusieurs processus cellulaires : i) la production de l'énergie (sous forme d'ATP) qui sera utilisée par d'autres organites et par le neurone, ii) la régulation de la concentration intracellulaire de Calcium, iii) la conservation des potentiels membranaires via des transporteurs actifs de Na^+/K^+ et de Ca^{2+} dépendants d'ATP, iv) le transport au niveau de l'axone et des dendrites, v) la libération de neurotransmetteurs dans les synapses et vi) la protection contre le stress oxydant (Knott *et al*, 2008). Ces processus sont modifiés lors de la maladie d'Alzheimer.

La mitochondrie est le principal organe producteur de radicaux libres via la phosphorylation oxydative (la voie par laquelle la mitochondrie produit ATP). Ces radicaux sont transportés vers le cytoplasme par des canaux anioniques dépendants du voltage, où ils peuvent participer à l'oxydation des lipides ainsi que des protéines et du DNA (Knott *et al*, 2008 ; Reddy, 2009 ; Crouch *et al*, 2008).

Le lien entre la maladie d'Alzheimer et la dysfonction mitochondriale est mis en évidence d'après certaines observations issues de différents travaux de recherche :

- Diminution des niveaux de l'activité des enzymes cytochrome oxydase (COX), pyruvate déshydrogénase et α -cétodéshydrogénase (Reddy and Beal, 2008).
- Altération de la morphologie de la mitochondrie ainsi qu'une diminution du nombre de mitochondries (Hirai *et al*, 2001 ; Simakova and Arispe, 2007).
- Accumulation du ADN mitochondrial (ADNmit) ainsi que l'apparition de mutations et/ou délétions (Coskun *et al*, 2004).

Ces observations ont contribué à proposer des mécanismes par lesquels A β pourrait altérer la fonction mitochondriale. La Figure 15 montre une représentation schématique de la phosphorylation oxydative qui se produit en deux grandes étapes :

Etape 1 : la génération d'un gradient de protons dû à plusieurs réactions d'oxydation-réduction liées aux complexes I, III et IV (cI, cIII et cIV).

Etape 2 : ce gradient génère de l'énergie électrochimique, appelée force « proton motrice », avec comme résultat la translocation passive des protons à travers le complexe V ou ATP synthase. Cette énergie est utilisée pour la réaction d'addition d'un groupe phosphate à la molécule d'ADP, produisant de cette façon de l'ATP.

Le peptide amyloïde A β inhibe l'activité cytochrome oxydase du complexe IV, diminuant par conséquent le gradient de protons et finalement la production d'ATP. Une autre conséquence, liée à l'interruption du transport des électrons au niveau du complexe IV, est l'augmentation de la production des espèces réactives d'oxygène (ROS, pour *Reactive Oxygen Species*). Les ROS peuvent induire des mutations et/ou des délétions chez le ADNmit.

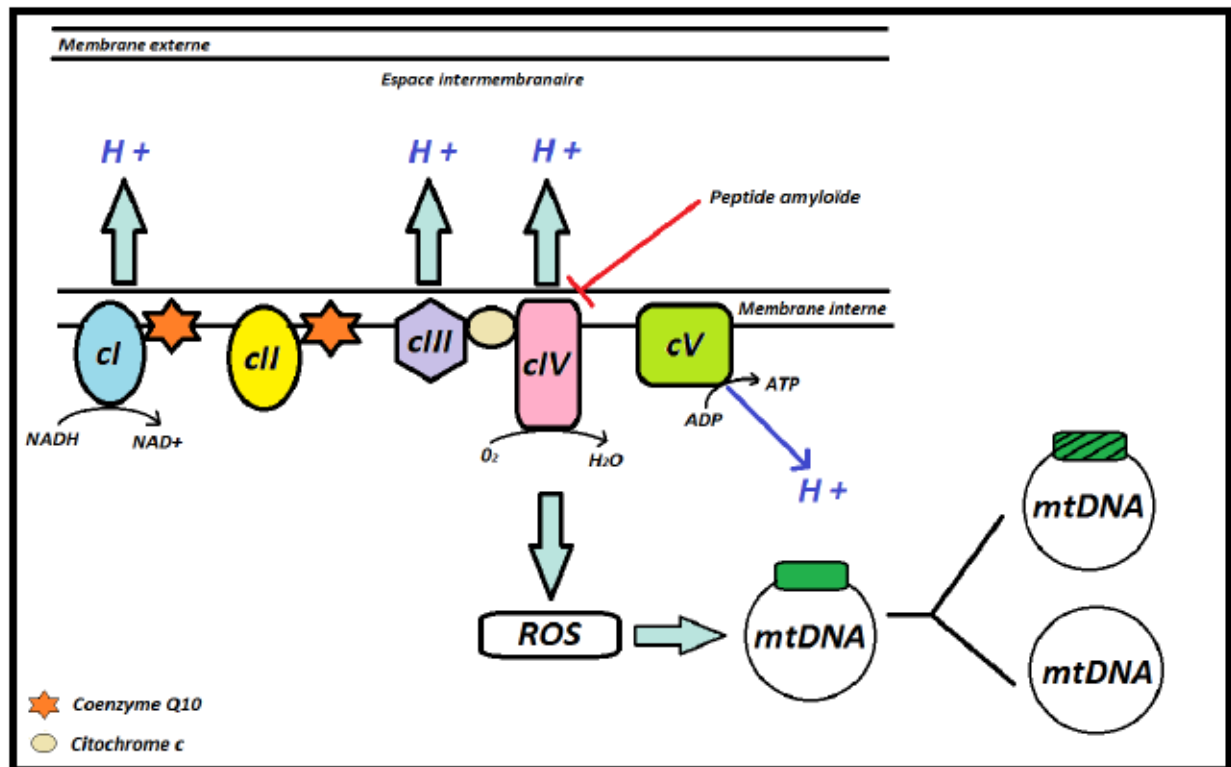


Figure 15. La chaîne de transport des électrons se voit modifiée par la présence du peptide amyloïde, qui exerce un effet inhibiteur sur le complexe IV de cette chaîne, diminuant de cette façon le gradient de protons dans l'espace inter-membranaire et par conséquent, la production d'ATP. D'autre part, cette inhibition contribue au stress oxydant au sein des neurones.

3.3.3. Les dégénérescences neurofibrillaires

Un autre événement, souvent attribué à la toxicité du peptide $A\beta$, est l'induction de la formation de dégénérescences neurofibrillaires. Il s'agit de lésions au niveau intracellulaire produites par une phosphorylation anormale d'une protéine appelée *Tau*.

Tau est une protéine associée aux microtubules, qui est exprimée au sein des systèmes nerveux central et périphérique, constituant un élément très important du cytosquelette des neurones, où elle se trouve majoritairement au niveau des axones mais aussi en faibles quantités au niveau des dendrites (De Paula *et al*, 2009 ; Ittner and Götz, 2011).

Parmi les fonctions attribuées à cette protéine se trouvent la stabilisation des microtubules à travers son union à la tubuline et la régulation du transport tout au long de l'axone. Dans les neurones, les microtubules jouent un rôle essentiel dans le maintien, de la morphologie et de la structure du neurone (Kolarova *et al*, 2012).

A l'heure actuelle, six isoformes de la protéine *Tau* ont été identifiées. Ces isoformes diffèrent par leur taille (entre 352 et 441 acides aminés) et par leur nombre de domaines de liaison à la tubuline (3 ou 4 domaines). L'interaction de *Tau* avec la tubuline constitue un processus dynamique par lequel *Tau* promeut sa propre polymérisation et la dépolymérisation rapide de la tubuline. Cette interaction est contrôlée par l'état de phosphorylation de *Tau*, qui contient au moins 84 sites de phosphorylation dont 45 serines, 35 thréonines et 4 tyrosines (De Paula *et al*, 2009 ; Ittner and Götz, 2011 ; Kolarova *et al*, 2012 ; Buée *et al*, 2000 ; Avila *et al*, 2004 ; Ballatore *et al*, 2007).

Dans la maladie d'Alzheimer, la fonction normale de *Tau* est affectée, conséquence de sa phosphorylation anormale (hyper phosphorylation), entraînant son incapacité à se lier aux microtubules. Ce phénomène conduit à la désorganisation du cytosquelette, et à l'agrégation et à l'accumulation intracellulaire de *Tau* d'où les dégénérescences neurofibrillaires. L'hyper phosphorylation de *Tau* affecte de façon négative certaines fonctions à l'intérieur du neurone, telle que la respiration mitochondriale, en inhibant le complexe I de la chaîne de transport d'électrons, (Figure 15), effet similaire à celui causé par l'inhibition du complexe IV de la chaîne, ainsi que le mouvement des mitochondries tout au long de l'axone (De Paula *et al*, 2009 ; Ittner and Götz, 2011). Cette inhibition de la phosphorylation oxydative a contribué à proposer que les effets de l'agrégation d'A β et de *Tau* pouvaient être synergétiques et amplifier la toxicité au niveau cellulaire (Rhein *et al*, 2009).

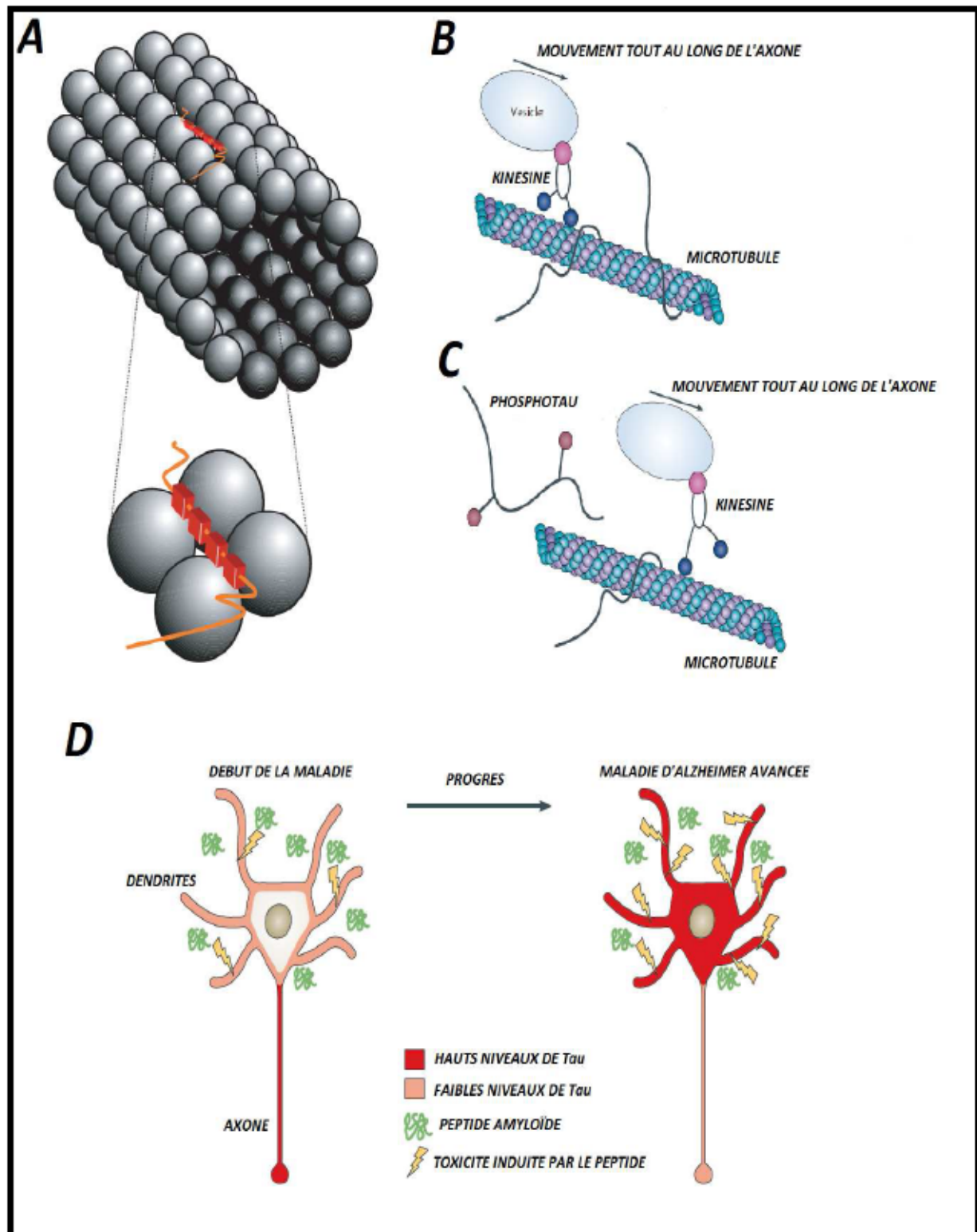


Figure 16. A) Schéma de l'association de la protéine Tau (en rouge) avec les microtubules (d'après Avila et al, 2004). B et C) Le transport axonal dépend de l'état de phosphorylation de la protéine Tau (d'après Ballatore et al, 2007). D) Le mécanisme est proposé pour expliquer la participation de Tau lors de la maladie d'Alzheimer. Les effets toxiques de A β au niveau des dendrites sont mitigés par la faible présence de Tau à cet endroit. Une fois que la maladie progresse, et que Tau s'accumule dans les dendrites, les effets de A β sur les neurones sont plus prononcés (d'après Ittner et al, 2011)

□

□

Chapitre 4 : La barrière hémato-encéphalique, ses transporteurs et leur rôle dans le développement de la maladie d'Alzheimer

4.1.- La barrière hémato-encéphalique (BHE)

La barrière hémato-encéphalique (BHE) constitue une barrière physique et métabolique qui isole le cerveau du reste de l'organisme. Elle est localisée à l'interface sang-tissu cérébral, où elle accomplit des fonctions diverses parmi lesquelles : i) la prévention de la diffusion paracellulaire de solutés hydrophiles, ii) l'efflux de molécules hydrophobes et de médicaments vers le sang en empêchant ces derniers de rentrer dans le cerveau, iii) la régulation de la migration endothéliale de cellules sanguines circulantes ainsi que de pathogènes et la médiation du transport actif de nutriments vers le cerveau (Weiss *et al*, 2009).

Composition de la BHE :

- i) les **cellules endothéliales** qui assurent l'intégrité de la barrière. Elles ont un niveau de spécialisation très élevé, montrant un phénotype unique déterminée par la présence de jonctions serrées et l'expression polarisée de nombreux transporteurs, d'où la grande restriction et le contrôle de la perméabilité de la BHE. De plus, en raison de leur forte activité métabolique, elles présentent une augmentation du nombre de mitochondries (Weiss *et al*, 2009 ; Carvey *et al*, 2009) ;
- ii) les **astrocytes**, cellules gliales présentant des prolongements importantes pour établir le contact avec les cellules endothéliales sans lequel la structure de la BHE ne serait pas optimale ;
- iii) les cellules de la **microglie**, cellules qui constituent la première ligne de défense contre les agents infectieux en promouvant les réponses immunitaires de type inné ou adaptative;

iv) les **péricytes**, cellules de type musculaire lisse, distribuées tout au long du capillaire cérébral couvrant près de 32% de la surface de ce dernier et qui contribuent au support structurel des cellules endothéliales ;

v) les **neurones**, cellules régulatrices de la dynamique des vaisseaux sanguins

vi) la **membrane basale**, partie essentielle de la BHE composée de trois couches générées par l'interaction des cellules endothéliales, astrocytes et péricytes (Weiss *et al*, 2009 ; Carvey *et al*, 2009 ; Solito and Sastre, 2012 ; Cardoso *et al*, 2010 ; Ballabh *et al*, 2004 ; Rogers *et al*, 2002) (Figure 17).

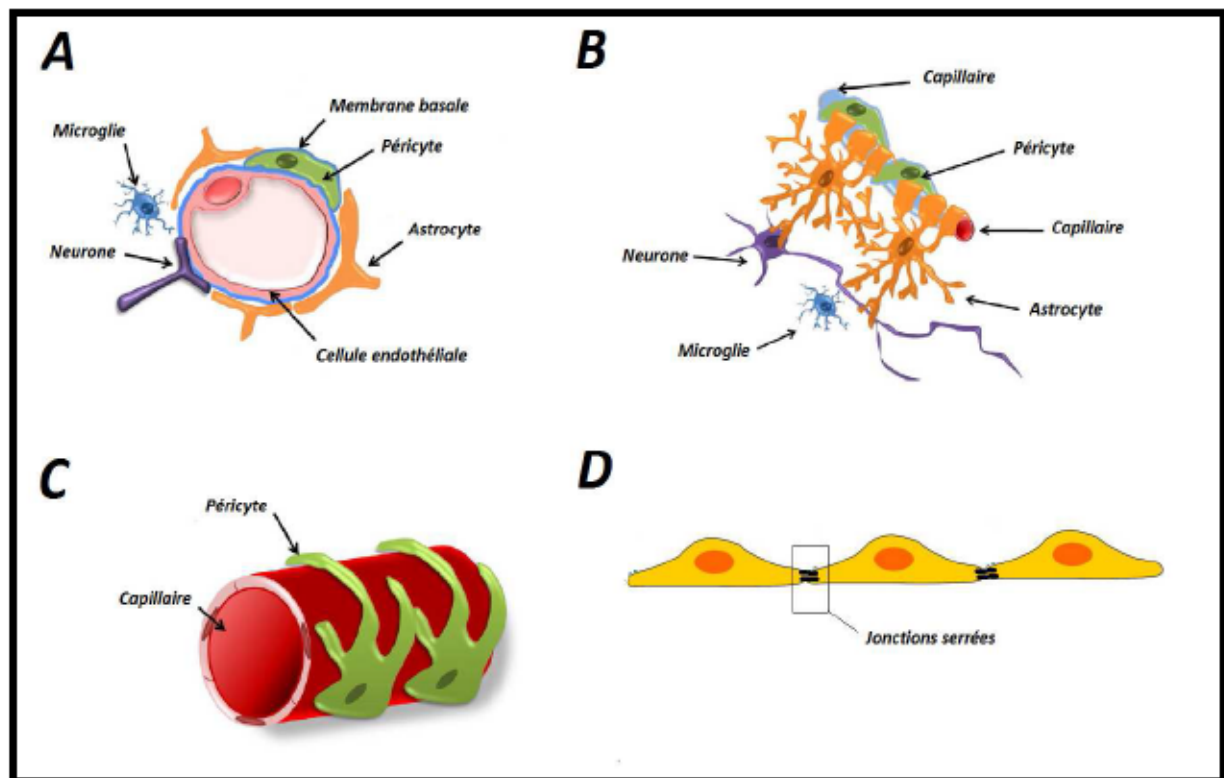


Figure 17. A) Schéma général de la disposition des cellules composant la BHE. B) Interaction entre les cellules de la BHE. C) Association physique entre les péricytes et l'endothélium. Les péricytes occupent environ 32% de la surface du capillaire cérébral. D) Vue schématique des cellules endothéliales montrant les jonctions serrées. D'après Weiss *et al*, 2009 ; Cardoso *et al*, 2010)

4.2.- La barrière hémato-encéphalique vis à vis de la perméabilité

En raison des caractéristiques très particulières de la BHE décrites ci-dessus, spécialement la présence des jonctions serrées, la perméabilité de la BHE vis à vis des molécules qui doivent la traverser est faible et elle constitue un grand obstacle à leur passage soit dans des conditions physiologiques « normales », soit dans le contexte du développement de molécules pour le traitement de différentes maladies. La maladie d'Alzheimer ne constitue pas une exception à cette difficulté. Néanmoins, il y a plusieurs mécanismes par lesquelles les molécules arrivent à traverser la BHE (Gabathuler, 2010 ; Figure 18) :

- Les petites molécules solubles qui sont nécessaires pour le bon fonctionnement du cerveau et la survie des neurones sont prises en charge par des transporteurs exprimés dans les cellules endothéliales. C'est le cas par exemple du glucose et des acides aminés.
- Les grandes molécules, solubles ou non, utilisent des récepteurs exprimés par les cellules endothéliales. Ces récepteurs endocytent les molécules. C'est le cas des hormones, de l'insuline et des lipoprotéines.
- Les petites molécules lipophiles peuvent diffuser passivement à travers la BHE, ces molécules peuvent être caractérisée par un paramètre connu comme le coefficient de partition octanol/tampon à pH 7,4 exprimé en $\log D$ (Clark, 2003). Cependant, ces molécules sont soumises aux pompes d'efflux qui les transporteront vers le sang.

Parmi ces mécanismes, nous nous sommes intéressés, dans cette thèse, au transport de certaines molécules via les pompes d'efflux présentes dans la BHE appartenant à la famille des transporteurs ABC, et, plus particulièrement, à un transporteur spécifique qui sera dévoilé par la suite.

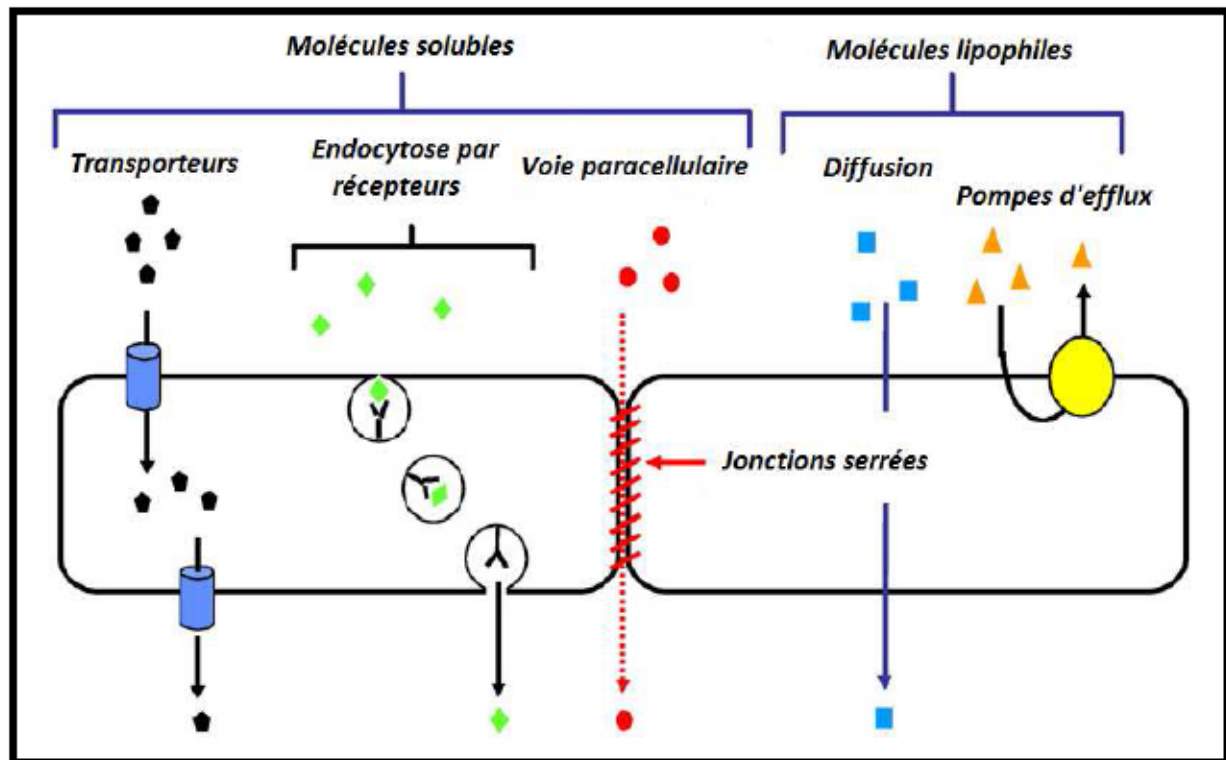


Figure 18. Différentes voies utilisées par les molécules qui doivent traverser la BHE. D'après Gabathuler 2010

4.3.- Les transporteurs ABC

Malgré les critères définis pour le passage des molécules à travers la BHE ainsi que la caractérisation des différents mécanismes de pénétration de celles-ci, des exceptions ont été trouvées. Pour un certain groupe de molécules, une perméabilité faible est observée malgré un $\log D$ qui prédit une entrée facile. La raison de cette disparité n'est autre que la présence de membres de la famille de transporteurs ABC (de l'anglais *ATP Binding Cassette*). Le principal rôle de ces transporteurs dans la BHE est d'assurer l'efflux actif des molécules de l'endothélium cérébral vers le sang, en consommant de l'ATP afin d'accomplir cette tâche (Abbott *et al*, 2010). Dans ce contexte, ces transporteurs sont des facteurs clés pour l'élimination de molécules endogènes ou exogènes qui peuvent être potentiellement neurotoxiques.

Chez l'homme, la famille de transporteurs ABC est composée de 48 membres regroupés dans 7 sous-familles (dénommées de A à G) en fonction de leurs caractéristiques structurales (Dean *et al*, 2001). Cette thèse porte sur la P-glycoprotéine ou P-gp, censée participer à l'efflux du peptide amyloïde, ce qui de nos jours ne fait pas l'unanimité de la communauté scientifique.

4.4.- La P-Glycoprotéine (P-gp)

La P-gp est le premier transporteur de la famille ABC à avoir été cloné et caractérisé chez les mammifères en raison de sa capacité à donner un phénotype de résistance à de nombreux médicaments (MDR, pour *Multidrug Resistance*) à des cellules cancéreuses.

La P-gp est présente dans tout le corps humain, à de faibles niveaux dans plusieurs tissus et à des niveaux plus élevés dans des surfaces épithéliales. Elle est présente dans le **foie**, pour assurer la sécrétion de médicaments dans la bile, l'**intestin**, pour assurer la prise en charge de substrats toxiques et leur excrétion à travers le tractus gastro-intestinal, le **placenta** pour protéger le fœtus des substances toxiques, le **rein**, pour l'efflux des molécules toxiques du sang vers l'urine, le **poumon**, pour assurer l'efflux d'agents toxiques inhalés avec l'air, les **testicules** pour assurer la protection de la maturation des cellules germinales en assurant l'élimination des métabolites endogènes potentiellement toxiques et dans la **BHE** sujet qui sera développé par la suite (Dahvale *et al*, 2008 ; Eckford and Sharom, 2008 ; Leslie *et al*, 2005 ; Schinkel and Jonker, 2003 ; Staud *et al*, 2010 ; Wessler *et al*, 2013) ; (Figures 19 et 20).

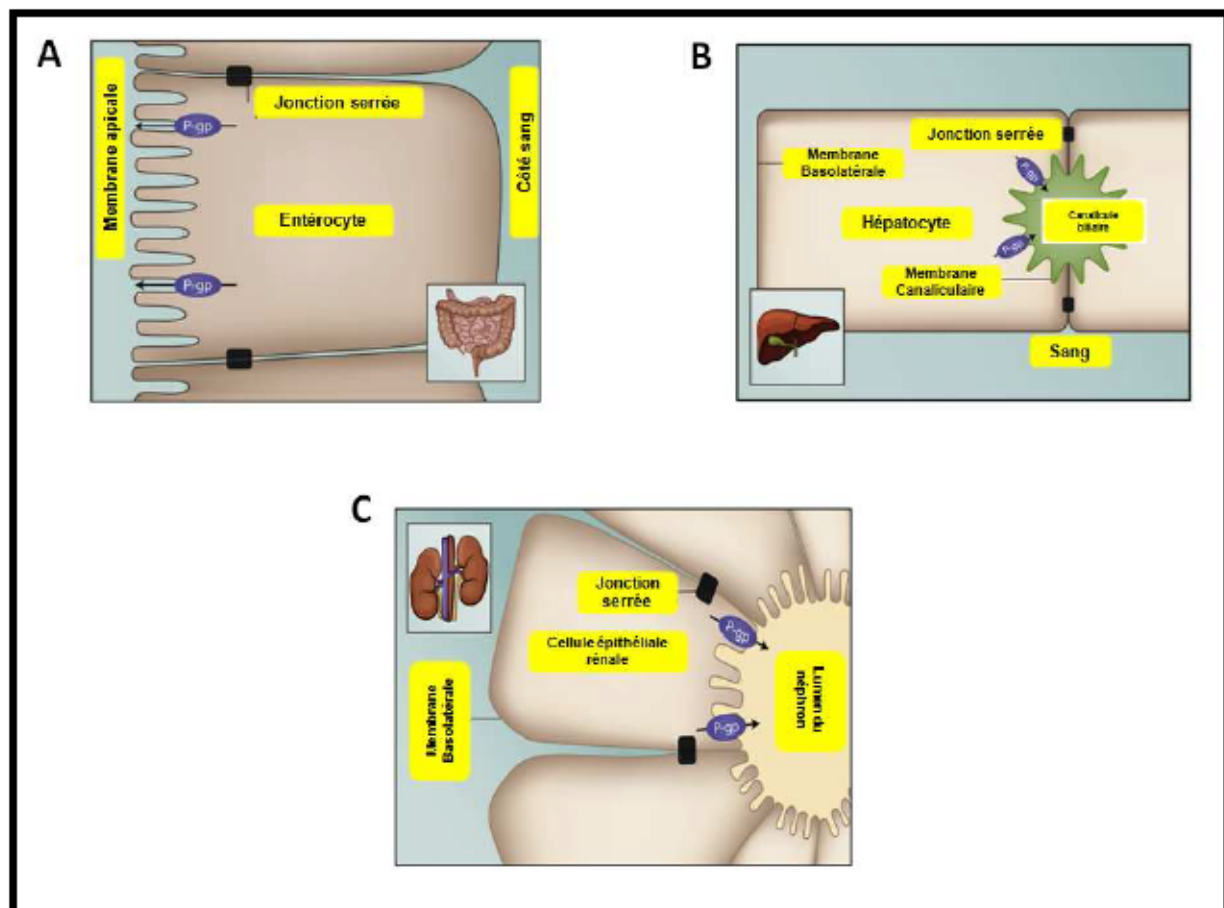


Figure 19. Distribution cellulaire et tissulaire de la P-gp chez l'humain. La P-gp est présente dans tout le corps humain, assurant l'efflux de molécules dans le système digestif (A), le foie (B) et les reins (C). D'après Wessler et al (2013).

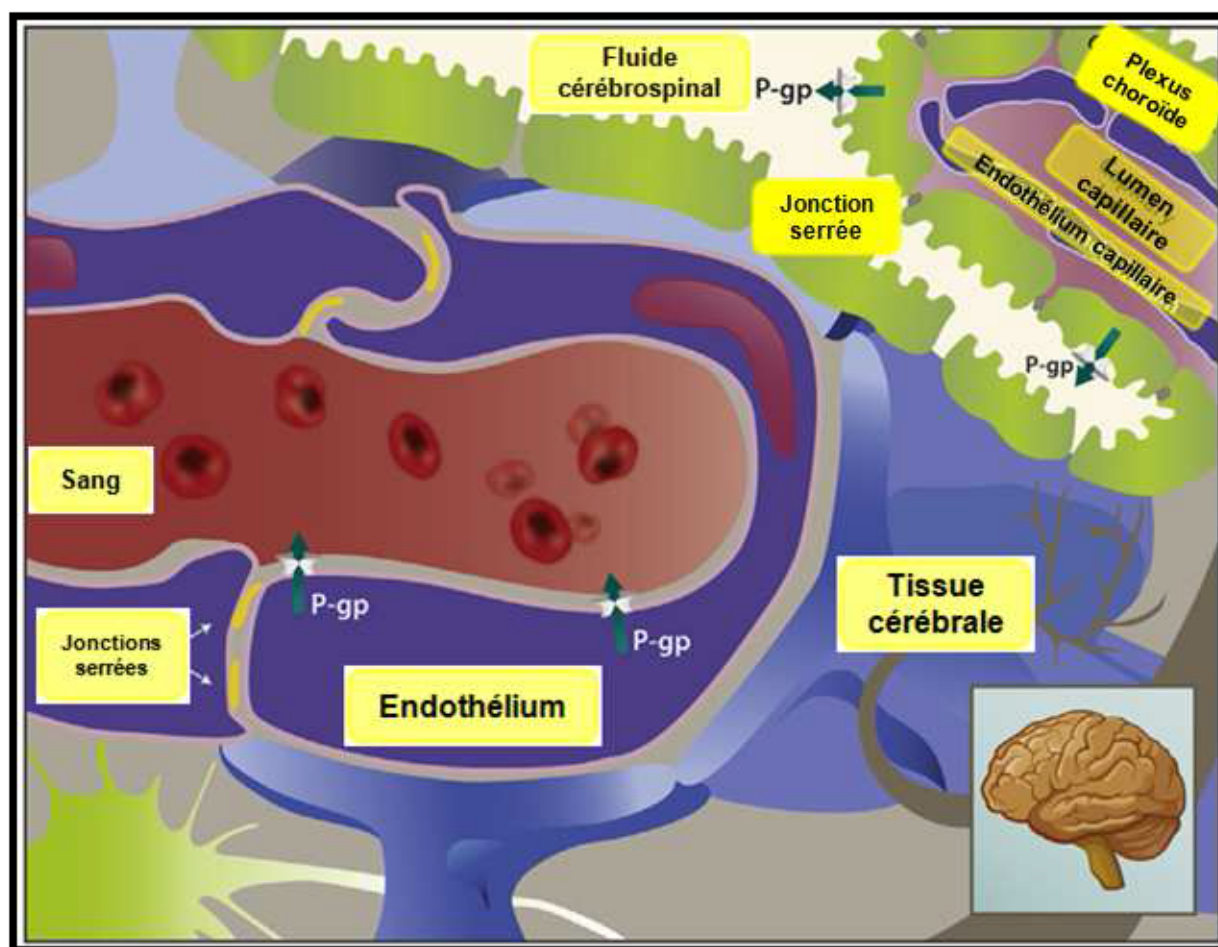


Figure 20. Distribution cellulaire de la P-gp au sein de la BHE. D'après Wessler et al (2013)

Chez l'humain, la P-gp est un polypeptide transmembranaire avec un poids moléculaire de 170 kDa et 1280 acides aminés. Cette protéine est constituée de deux parties homologues avec 6 hélices transmembranaires chacune. Ces deux parties sont séparées par une région de 80 acides aminés. De plus, chaque partie comporte un domaine de liaison aux nucléotides (NBD, pour *Nucleotide Binding Domain*). S'agissant d'un transporteur de la famille ABC, le nucléotide utilisé pour accomplir son activité est l'ATP (Schinkel, 1999 ; Linton, 2007 ; Sharom, 2008 ; Dahvale *et al*, 2008) (Figure 21).

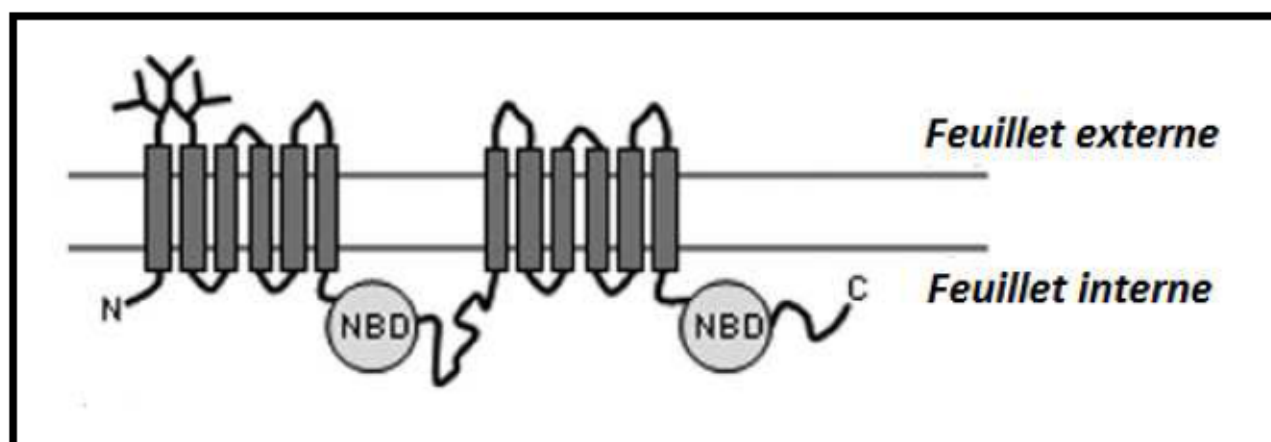


Figure 21. Structure schématique de la P-Glycoprotéine. D'après Eckford and Sharom, 2009

La P-glycoprotéine, ainsi que certains autres transporteurs de la famille ABC, transporte un grand nombre de substrats de tailles comprises entre 200 et 1900 Da (voir Tableau VII, page 111). La plupart de ces substrats sont des molécules organiques comportant des cycles aromatiques. De plus, pour être transportés efficacement, les substrats doivent être neutres ou basiques par défaut. Le transport de molécules chargées positivement a été observé. La seule caractéristique commune des substrats de la P-gp est leur nature amphiphile (Eckford and Sharom, 2009 ; Schinkel and Jonker, 2003 ; Wolf *et al*, 2012).

4.4.1. Le cycle catalytique du transport de substrats par la P-gp

Les premiers travaux concernant le transport de molécules actives prises en charge par la P-gp ont montré qu'il y avait une hydrolyse de l'ATP, observation qui fut confirmée par la suite avec d'autres transporteurs de la famille ABC, tels que MRP1 (pour *Multidrug resistance-associated protein 1*) et ABCG2 (pour *ATP-binding cassette sub-family member 2*). Il a également été constaté qu'en absence de substrat, ces trois protéines exhibent une activité ATPasique basale. Cette activité basale est modulée par la présence de leurs substrats : elle peut être inhibée ou stimulée en présence de certains d'entre eux ou bien avoir

un comportement biphasique, dans lequel l'activité est stimulée ou inhibée selon la concentration de substrat employée (Urbatsch *et al*, 1994 ; Glavinas *et al*, 2007).

Trois modèles de fonctionnement du cycle catalytique de transport de la P-gp sont actuellement proposés (Figure 22) :

1. *La dimérisation des domaines d'union aux nucléotides comme événement déclencheur du transport* (Higgins and Linton, 2004 ; Figure 22a): le substrat se lie à un site spécifique du domaine transmembranaire (I), diminuant ainsi l'énergie d'activation et favorisant l'affinité du transporteur pour l'ATP. Le résultat est la dimérisation des deux domaines d'union aux nucléotides. Ce changement de conformation conduit à l'efflux de la molécule (II). Deux événements successifs d'hydrolyse de l'ATP (III et IV) apportent l'énergie nécessaire pour séparer le dimère et rendre le transporteur à sa conformation originelle, sans nucléotide (V).
2. *L'hydrolyse de l'ATP comme élément déclencheur du transport* (Sauna and Ambudkar, 2001 ; Figure 22b) : le cycle commence avec l'union de l'ATP et du substrat sans que chaque événement affecte l'autre (I). L'ATP, lié à un des deux domaines d'union aux nucléotides, est hydrolysé (II), produisant le changement de conformation nécessaire pour effluer le substrat et rendre les domaines inaccessibles aux nucléotides (III). La libération du phosphate inorganique (Pi) et de l'ADP rend à nouveau accessibles les domaines d'union aux nucléotides (IV). Cependant, le changement de conformation continue et le transporteur reste incapable de se lier à une autre molécule de substrat. C'est seulement après l'union, hydrolyse et libération des produits d'une seconde molécule d'ATP (V, VI et VII), que le transporteur revient à son état d'origine (VIII).
3. *Le cycle du transport constitue un événement couplé* (Al-Shawi *et al*, 2003 ; Figure 23) : le transport du substrat s'effectue suivant un cycle qui combine simultanément

les deux mécanismes décrits ci-dessus. Un cycle est alors couplé au transport du substrat, tandis que l'autre ne l'est pas. L'efflux du substrat a lieu lors de la formation du complexe substrat-ATP-transporteur durant le cycle couplé.

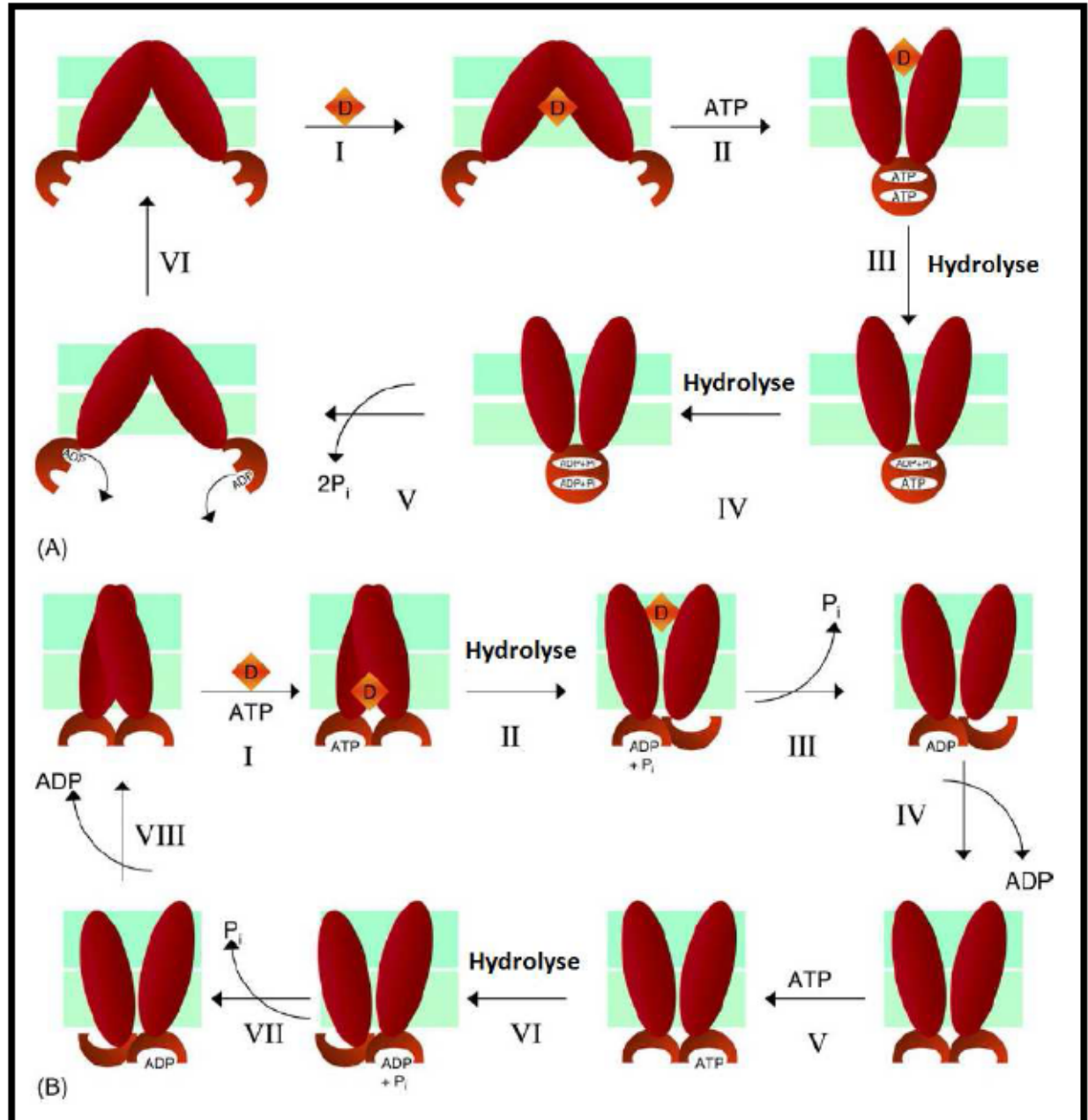
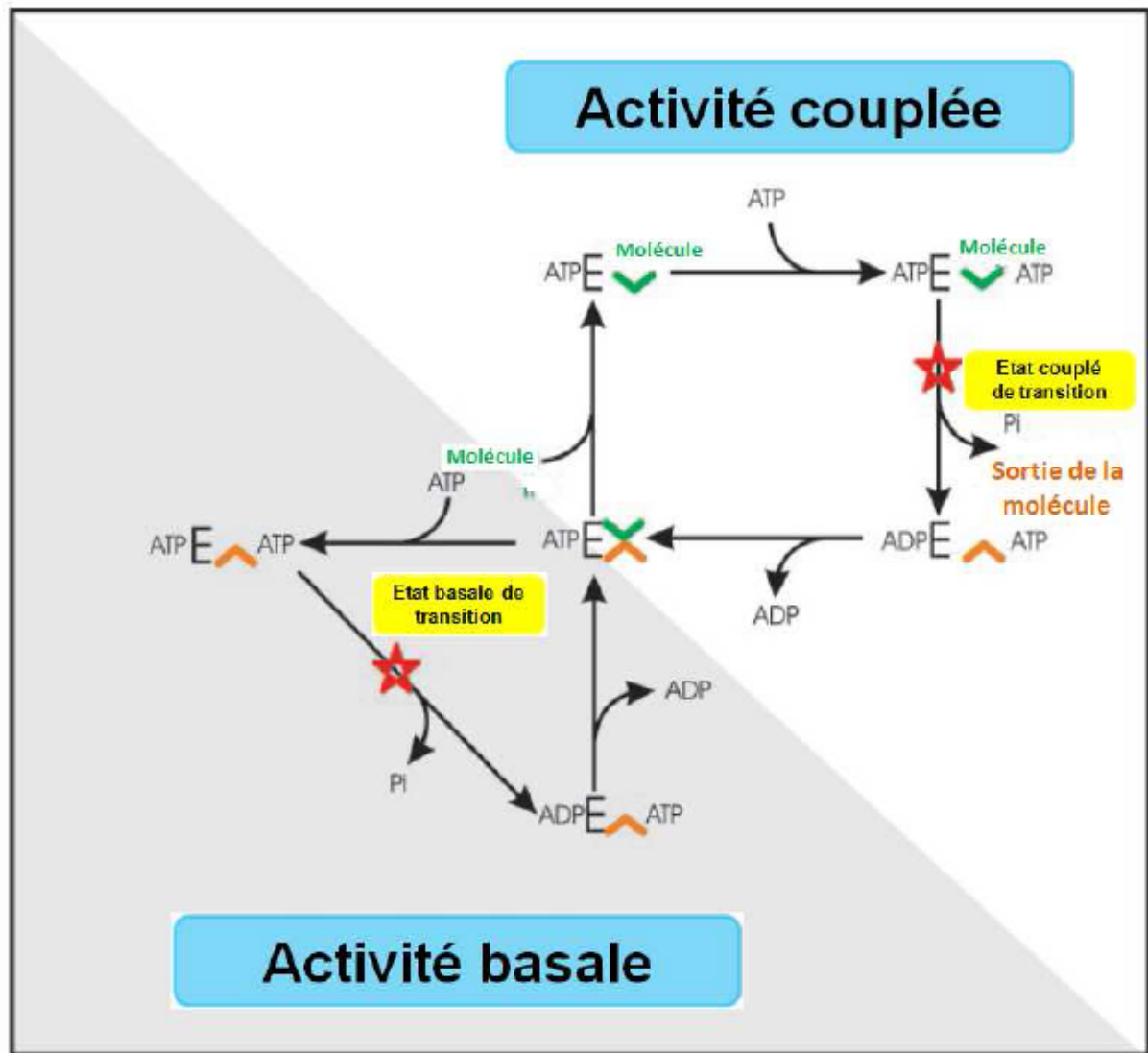


Figure 22 : Deux des modèles proposés pour expliquer le cycle catalytique du transport de substrat par la P-gp. Ces modèles diffèrent sur le fait que soit c'est l'union de l'ATP aux domaines de fixation des nucléotides et la dimérisation de ces derniers (A) ou soit l'union et hydrolyse de l'ATP (B), l'événement qui déclenche le cycle. D'après Ambudkar et al, 2006



Le processus de transport d'un substrat par la P-gp peut être expliqué à travers plusieurs mécanismes. A l'heure actuelle, il existe trois modèles proposés pour le transport (Varma *et al*, 2003 ; Sharom, 2008 ; Eckford and Sharon, 2009) (Figure 24):

- **Le modèle du pore** : le substrat interagit avec la P-gp une fois qu'il est dans le compartiment intracellulaire et est alors efflué à travers le transporteur.
- **Le modèle de la flippase** : ce modèle requiert une localisation du substrat dans le cytoplasme, où il interagit avec la P-gp et est ensuite transloqué vers la partie extérieure de la membrane. Finalement, il est efflué passivement vers le fluide extracellulaire.
- **Le modèle de l'aspirateur** : constitue une combinaison des deux modèles antérieurs.

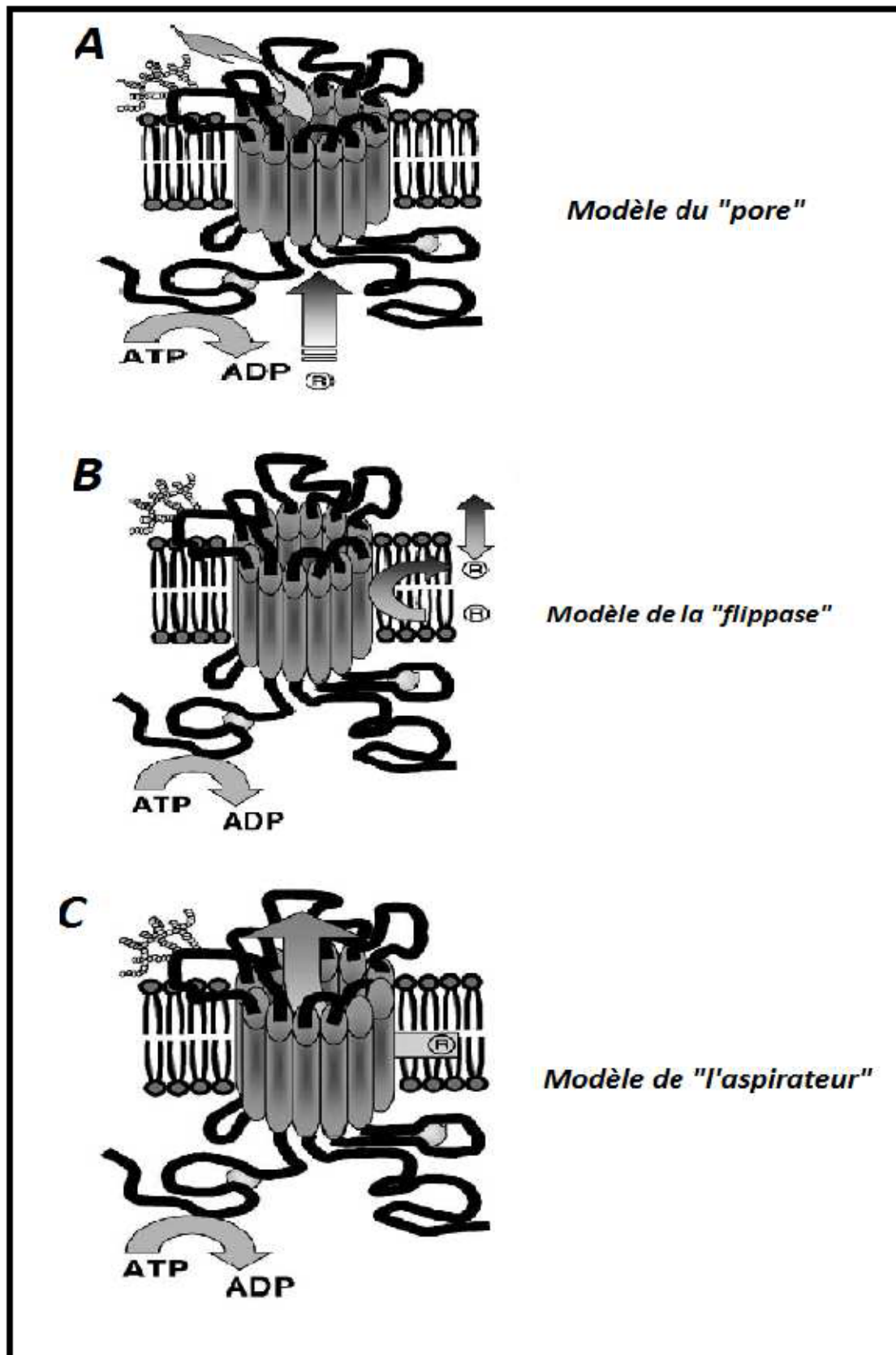


Figure 24 : Les trois modèles proposés pour expliquer le transport de substrats fait par la P-gp. D'après Varma et al, 2003

4.5.- Les voies physiologiques de l'influx et de l'efflux des peptides A β à travers la BHE

Il a été proposé que l'entrée des peptides amyloïdes dans l'endothélium cérébral était assurée par le récepteur des produits de glycation avancée (RAGE pour *Receptor of advanced glycosylation products*) (Deane *et al*, 2003). Ce récepteur est capable d'interagir avec plusieurs formes de A β et de produire ainsi des réponses pathologiques telles que le stress oxydant et l'activation de la microglie. L'interaction A β -RAGE dépend des apolipoprotéines non situées dans les membranes, ApoE et ApoJ. Dans des conditions physiologiques, les niveaux d'expression de RAGE sont faibles. Cependant, comme résultat du vieillissement, l'accumulation de A β , induit la surexpression de celui-ci. Le peptide A β , est un ligand de RAGE. La surexpression de RAGE entraîne une augmentation de l'entrée d'A β dans le cerveau, déclenchant ainsi son accumulation. D'autre part, il est maintenant accepté que la sortie des peptides A β soit assurée par le récepteur de lipoprotéines de faible densité (LRP1 pour *Low-density lipoprotein receptor related protein*). L'union A β -LRP1 dans la partie basale de la BHE (côté cerveau) constitue le premier événement pour l'élimination de A β du cerveau vers le sang. Dans les conditions pathologiques de la maladie d'Alzheimer, l'expression de LRP1 est diminuée, contribuant à l'accumulation du peptide et à la formation des plaques séniles (Zlokovic, 2008 ; Weiss *et al*, 2009 ; Bu *et al*, 2006 ; Shibata *et al*, 2000) (Figure 25).

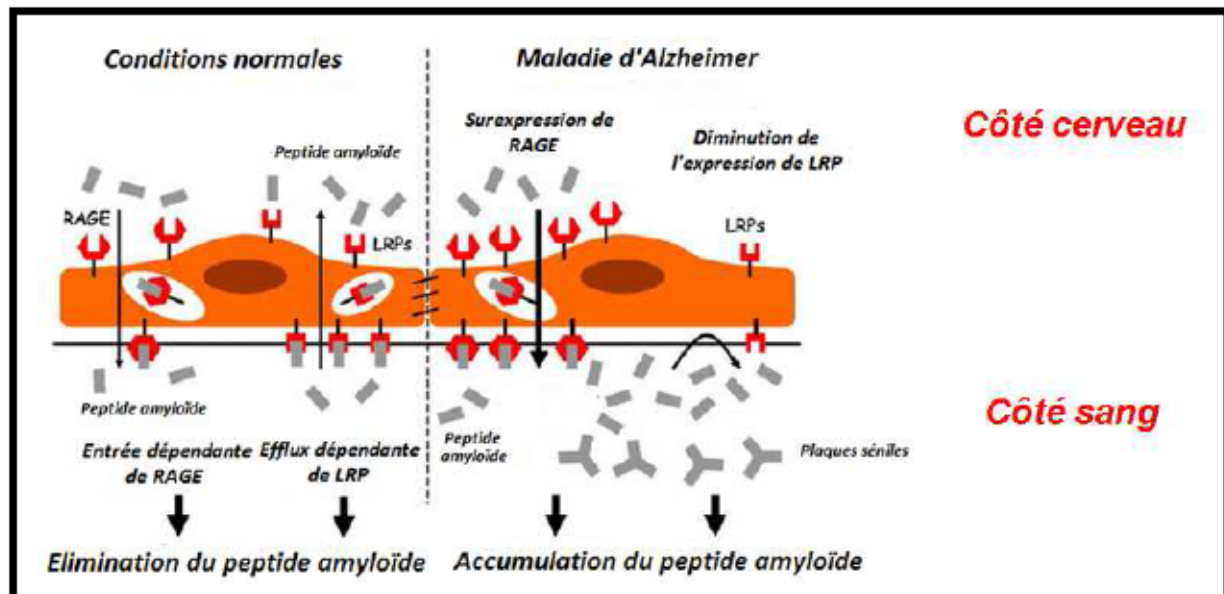


Figure 25. Mécanisme proposé pour l'entrée et la sortie du peptide amyloïde dans le cerveau à travers les cellules endothéliales dans des conditions normales et lors de la maladie d'Alzheimer. D'après Weiss et al, 2009

4.6.- La P-gp et le transport des peptides amyloïdes

Malgré l'apparent consensus qui existe autour de la participation du LRP1 dans le transport des peptides A β (Shibata *et al*, 2000 ; Deane *et al*, 2004 ; Deane *et al*, 2008 ; Fujiyoshi *et al*, 2011), il reste à savoir quelle est la route poursuivie par ces derniers. LRP1 étant dans la membrane abluminale (côté cerveau) des capillaires cérébraux, l'éventuel transport de A β impliquant ce récepteur aurait comme résultat sa libération dans l'endothélium. Il faudrait donc un mécanisme qui permette le passage de A β vers la partie luminale (côté sang) des capillaires. Il a été proposé que la P-gp puisse jouer un rôle dans l'élimination du A β cérébral, mais pour l'instant les arguments existants sont contradictoires.

Le premier travail de recherche suggérant un transport de A β par la P-gp a été fait par Lam et collaborateurs (2001). En utilisant des vésicules de membranes plasmiques de la lignée cellulaire CH^RB30 qui surexprime la P-gp marquée avec un fluorophore, les auteurs

ont trouvé qu'il y avait une extinction de la fluorescence lorsque les vésicules sont mises en présence de concentrations croissantes de A β 40 ou de A β 42. Ceci suggère l'existence d'une interaction entre le transporteur et les peptides. Une augmentation de l'activité ATPase dans ces vésicules, en présence des peptides amyloïdes, a également été observée. Etant donné que la consommation d'ATP est nécessaire pour l'activité de transport de la P-gp, cette étude a conduit ces auteurs à postuler que la P-gp jouait un rôle dans le transport de A β . Cette dépendance énergétique a été démontrée par l'utilisation d'un analogue non hydrolysable de l'ATP appelé AMP-PNP.

En relation avec l'idée proposée par le travail précédent, en 2005 Cirrito et collaborateurs, ont suivi l'accumulation de A β marqués ([¹²⁵I] A β 40 et [¹²⁵I] A β 42), administré par micro injection, dans des souris qui n'expriment pas la P-gp (*mdr1 a/b*^{-/-}) et des souris « témoins ». La quantité de peptide restant dans le cerveau s'est révélée plus importante chez les souris n'exprimant pas la P-gp par rapport aux souris « témoins ». Ce résultat est renforcé avec le fait que l'inhibition pharmacologique de la P-gp conduit aussi à une accumulation des peptides A β .

Ces observations, c'est-à-dire le transport de A β dans des cellules qui sur expriment la P-gp et l'accumulation du peptide en présence des inhibiteurs de ce transporteur, ont été confirmés en 2010 par Hartz et collaborateurs en utilisant le modèle de souris pour la maladie d'Alzheimer *Tg2576*. La mesure du transport dans les capillaires cérébraux de ces souris a conduit à des résultats en accord avec ceux de Lam et collaborateurs (Lam *et al*, 2001) et de Cirrito et collaborateurs (Cirrito *et al*, 2005). Hartz et collaborateurs ont observé une réduction du niveau de A β cérébral lorsque l'activité de la P-gp est restaurée ; ils proposent également un mécanisme possible pour l'élimination du peptide amyloïde. Ce mécanisme à deux étapes implique d'abord l'interaction de A β avec LRP1 dans la membrane abluminale

des capillaires cérébraux. Le peptide délivré dans l'endothélium est alors immédiatement pris en charge par la P-gp, qui l'efflue vers le sang (Figure 26).

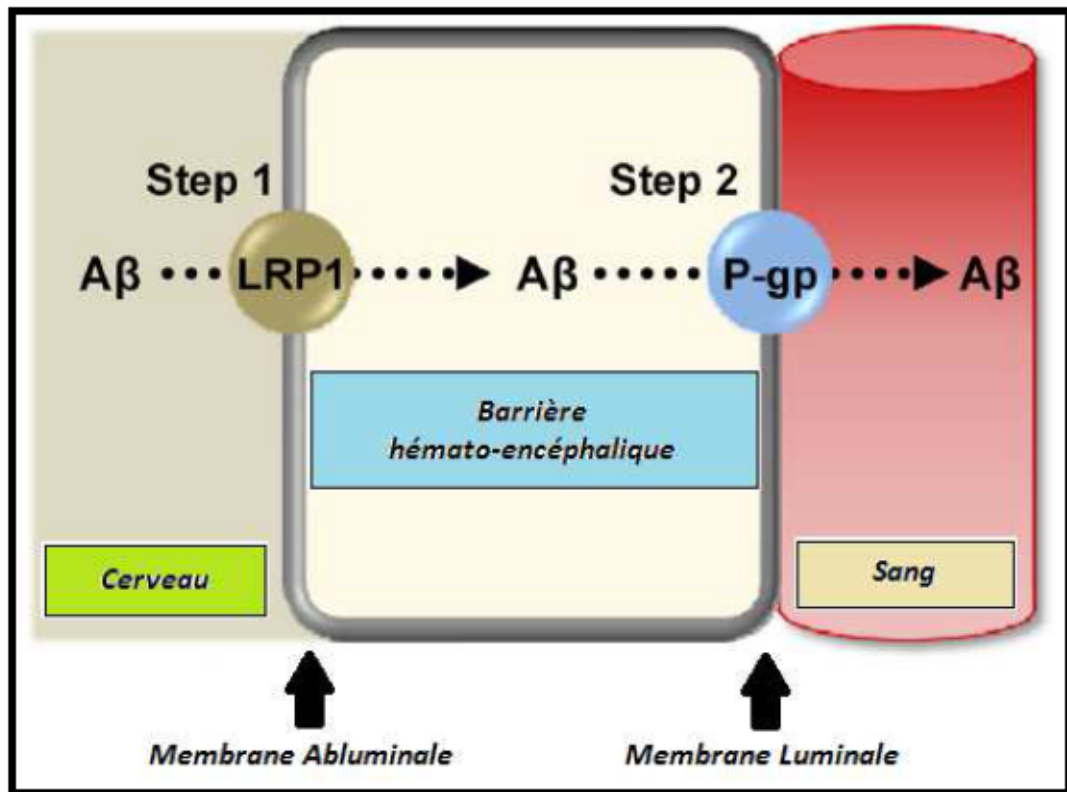


Figure 26. Mécanisme proposé pour l'efflux des peptides amyloïdes au niveau de la barrière hémato-encéphalique. D'après Hartz et al, 2010

Une étude à caractère plus clinique, effectuée après autopsie de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et d'individus sains respectivement a été publiée par Jeynes et Provias en 2010. Les résultats qui montrent une corrélation inverse entre la densité des plaques séniles, les dégénérescences neurofibrillaires et l'expression de la P-gp, permettent de proposer que la présence des plaques est liée à l'absence d'activité de la P-gp. Par ailleurs ces auteurs ont montré une corrélation positive entre la présence de la P-gp, LRP1 et RAGE. Autrement dit, le rôle de la P-gp pourrait être associé aux deux autres protéines.

Le mécanisme proposé par Hartz et collaborateurs en 2010, constitua le point de départ du travail de Brenn et collaborateurs en 2011. Ces auteurs ont étudié l'effet de

l'administration de A β sur l'expression de la P-gp et des autres transporteurs dans les cellules endothéliales de souris traitées non seulement avec les formes A β 40 et A β 42 classiques mais aussi avec des formes dans lesquelles la séquence d'acides aminés est inversée: A β (40-1) et A β (42-1). L'ARN des hémisphères cérébraux a été quantifié via la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR pour *Real Time Polymerase Chain Reaction*) et aussi par immunohistochimie. Ceci leur a permis de d'observer une réduction de l'expression de la P-gp, LRP1 et RAGE de 63, 57 et 65% respectivement, chez les souris traitées avec A β 42 par rapport aux contrôles. Des niveaux normaux de ces transporteurs ont été mesurés en présence de A β 40 ainsi qu'en présence des peptides de séquences inversées. Cependant, aucun changement quantitatif mesurable n'a été observé par immunohistochimie.

Le rôle possible de l'expression de la P-gp dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer a été aussi suggéré par Abuznait et collaborateurs en 2011. Ces auteurs ont observé que l'inhibition de la P-gp, exprimée dans la lignée cellulaire d'adénocarcinome de colon LS-180, à l'aide du vérapamil, un inhibiteur bien connu de l'activité de la P-gp, donne lieu à une accumulation intracellulaire importante du peptide ¹²⁵I-A β 40 par rapport aux cellules dans lesquelles la P-gp n'est pas inhibée.

Tous les résultats mentionnés ci-dessus sembleraient indiquer que la P-gp est capable de moduler l'élimination des peptides amyloïdes dans le cerveau, évitant ainsi son accumulation qui est l'événement déclencheur de la maladie d'Alzheimer. Pourtant, d'autres résultats contredisent cette proposition. Ces expériences sont présentées ci-dessous.

En 2006, Ito et collaborateurs ont étudié l'efflux dans des capillaires cérébraux du peptide ¹²⁵I-A β 40 administré à des rats Sprague Dawley. Lorsqu'on administre, par microinjection, le vérapamil et/ou la protéine associée au récepteur RAP (un antagoniste de LRP1) avant le traitement des rats avec ¹²⁵I-A β 40, on observe une diminution de l'efflux du

peptide d'environ 20% en présence de RAP par rapport aux témoins et une presque une invariabilité de l'efflux lorsqu'on est en présence ou non de l'inhibiteur de la P-gp. Ces résultats remettent en question toutes les propositions présentées ci-dessus, surtout le mécanisme proposé par Hartz et collaborateurs en 2010 étant donné que le rôle de LRP1 semble être « partiel » tandis que celui de la P-gp est insignifiant. Ceci suggère que l'efflux de A β pourrait être « confiée » à d'autres molécules non identifiées.

Ces conclusions ont été confirmées par Nazer et collaborateurs en 2008. Utilisant la lignée cellulaire MDCK (pour *Madin-Darby Canine Kidney*) transfectée ou non avec la P-gp, ces auteurs ont trouvé que la surexpression de la P-gp n'avait aucun effet sur le transport des peptides 125 I-A β . De plus, utilisant la lignée cellulaire endothéliale humaine hCMEC/D3, qui exprime le LRP1, ces auteurs ont montré un transport des peptides 125 I-A β , qui pouvait être inhibé par la présence de RAP, un inhibiteur de l'activité du LRP1.

Ces résultats montrent que la participation de la P-gp dans le transport du peptide amyloïde demeure incertaine et qu'il n'y a pas de consensus autour de cet aspect. Le tableau II résume les travaux mentionnés ci-dessous :

Tableau II. Résultats concernant la participation ou non de la P-gp au transport de A β .

Référence	Contribution possible de la P-gp au transport de A β	Contribution possible de LRP1 au transport de A β
Lam <i>et al.</i> (2001)	Oui	Non étudié
Cirrito <i>et al.</i> (2004)	Oui	Non étudié
Ito <i>et al.</i> (2006)	Non	Oui
Kuhnke <i>et al.</i> (2007)	Oui	Non étudié
Nazer <i>et al.</i> (2008)	Non	Oui
Hartz <i>et al.</i> (2010)	Oui	Oui
Jeynes and Provias (2010)	Oui	Oui
Abuznait <i>et al.</i> (2011)	Oui	Non étudié
Brenn <i>et al.</i> (2011)	Oui	Oui

□

□

□

□

Chapitre 5 : Matériels et Méthodes

□

5.1- Les appareils utilisés

5.1.1.- *Le compteur de cellules*

Le comptage des différentes lignées cellulaires utilisées a été fait à l'aide d'un compteur Beckman Coulter® Z Series couplé à un « channalyseur » Coultronics.

5.1.2.- *Les sonicateurs*

Deux sonicateurs ont été utilisés en fonction des objectifs désirés, à savoir :

1. Pour l'obtention des lysats cellulaires, le sonicateur VIBRACELL, *Sonics and materials INC* ; Dantbury Connecticut, USA.
2. Pour la préparation des solutions du peptide A β 42, le sonicateur *Branson 200 Ultrasonic Cleaner*.

5.1.3.- *Les centrifugeuses*

Trois centrifugeuses réfrigérées ont été utilisées:

1. La centrifugeuse *Eppendorf*, modèle 5702R, avec un rotor A-4-38
2. L'ultracentrifugeuse *Jouan*, modèle MR22i, avec un rotor AR50.14
3. L'ultracentrifugeuse *Beckman*, modèle TL100, avec un rotor TLA100.2

5.1.4.- Le spectrophotomètre d'absorption électronique

Les spectres d'absorption ainsi que les mesures d'absorbance ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible Cary 300 à double faisceau. Ces mesures ont été réalisées dans des cuvettes en quartz de 10 mm de trajet optique, à température ambiante ou à 37°C, selon le type d'expérience.

5.1.5.- Le spectrofluorimètre

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés à l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS50B couplé à un thermostat Thermomix 1441/Frigomix 1495 afin de maintenir la température à 37°C. D'autre part, un système d'agitation magnétique a permis de conserver les cellules en suspension homogène.

Le couple de fentes d'excitation et d'émission utilisées dépendait de la sonde fluorescente utilisée :

- Pour la Pirarubicine ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) il était de 10/10.
- Pour la TMR ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 573 \text{ nm}$) il était de 5/5
- Pour la MQAE ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$) il était de 10/10

Les expériences ont été réalisées dans des cuvettes en quartz de 1 cm² de section.

5.1.6.- Le générateur de courant

Le courant nécessaire à la séparation des protéines par électrophorèse verticale a été produit par le générateur de courant Consort, modèle EV231.

5.2.- Les lignées cellulaires

Pour la réalisation des expériences conçues dans ce travail, trois lignées cellulaires ont été utilisées :

1. *Les lignées K562 et K562/ADR* : ces lignées cellulaires d'origine humaine ont été isolées par Lozzio et Lozzio (1975) à partir des cellules d'un patient atteint de leucémie myéloïde chronique. Les lignées K562 et K562/ADR se distinguent entre elles par la sur-expression de la P-gp dans les cellules K562/ADR. Les cellules K562/ADR, tout comme les K562, sont des cellules en suspension ne formant pas d'agrégat. La culture des deux lignées est initialisée avec 10^5 cellules/ml, tous les trois jours, dans un milieu de culture frais (voir section 5.3) et la croissance se développe sous une atmosphère humide à 37 °C et 5% CO₂. La sur-expression de la P-gp est maintenue dans la lignée K562/ADR par un traitement, toutes les 4 semaines, avec de la doxorubicine à une concentration finale de 400 nM.
2. *La lignée SH-SY5Y* : La lignée SH-SY5Y est une lignée de neuroblastome d'origine humaine, représentative du système nerveux central. Elles ont été fournies par la société ATCC. Les cellules de la lignée SH-SY5Y sont très utilisées pour des études de neurobiologie, sa culture donne lieu à des cellules adhérentes. Ces cellules sont placées dans un milieu de culture, dont la composition est donnée dans la section 5.3, à une concentration initiale de 2×10^5 cellules/ml. Ceci est effectué tous les 3-4 jours. Selon les besoins, des flacons T25 ou T75 sont utilisés. A la fin de cette période, l'ancien milieu est enlevé et les cellules confluentes sont détachées grâce à l'addition de 1 ml d'une solution de 0,25 % Trypsine-EDTA pendant 3-7 minutes à 37°C. Le détachement des cellules est vérifié au microscope. L'action de la trypsine est ensuite stoppée par l'addition de milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal. Les

cellules sont séparées à l'aide d'une pipette, comptées et centrifugées. Finalement, le culot contenant les cellules est placé dans un nouveau milieu de culture jusqu'à la prochaine arrivée à confluence.

3. *La lignée hCMEC/D3* a été obtenue par l'immortalisation d'une culture cellulaire primaire de cellules endothéliales micro vasculaires issues du lobe temporal cérébral humain. L'immortalisation est faite par transfection des cellules avec un lentivirus qui code pour la sous unité catalytique de la télomérase humaine ainsi que pour l'antigène T de la phase SV40. Ces cellules poussent en monocouche (Weksler *et al*, 2013). Pour la culture, les cellules sontensemencées à une concentration de 3×10^5 cellules/ml dans un milieu de culture EBM-2 complet (voir section 5.3) dans des flacons de culture préalablement tapissés avec du collagène de rat de type I (BD Biosciences) à une concentration finale de 0,1 mg/ml. Ce tapissage est réalisé à 37°C pendant 1 heure. Les cellules placées dans le flacon tapissé sont incubées sous une atmosphère humide à 37 °C et 5% CO₂. La procédure de décollement est similaire à celle décrite pour les cellules SH-SY5Y.

5.3.- Les milieux de culture

Pour les lignées cellulaires K562 et K562/ADR le milieu RPMI 1640 GlutaMAX™-I (Gibco) supplémenté avec 10% v/v sérum de veau nouveau né décomplémenté (Gibco) et 1% pénicilline-streptomycine (Gibco) a été utilisé.

Pour la lignée cellulaire SH-SY5Y le milieu suivant est utilisé : milieu basal de culture (*Minimum Essential Medium MEM*, Sigma-Aldrich et *Nutrient Mixture F-12 HAM*,

Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10 % sérum de veau fœtal dé complémenté (Gibco), 2 mM L-Glutamine (Sigma-Aldrich) et 1% v/v pénicilline-streptomycine (Gibco) a été utilisé.

Pour la lignée cellulaire hCMEC/D3 le milieu suivant est utilisé : milieu basal de culture *Clonetics® EBM®-2* (Lonza) supplémenté avec 5% v/v sérum de veau fœtal (Gibco), 1% v/v pénicilline-streptomycine (Gibco), 1,4 μ M hydrocortisone (Sigma), 5 μ g/ml L-acide ascorbique (Merck), 10 mM HEPES (Sigma), 1 ng/ml facteur de croissance de fibroblastes humain (bFGF, Sigma) et 1/100 v/v concentré lipidique chimiquement défini (Gibco) a été utilisé.

5.4.- Solubilisation du peptide amyloïde A β 42

En raison de sa séquence d'acides aminés, le peptide A β 42 est très hydrophobe et nécessite des conditions de solubilisation particulières, pouvant être modulées en fonction de la provenance du peptide, même si chimiquement les peptides sont identiques. L'utilisation uniquement de solutions aqueuses entraîne la formation des grands agrégats. Par contre, une étape de solubilisation initiale à l'aide des solvants organiques fait disparaître les agrégats pouvant se trouver dans les peptides commercialisés. En outre, cette étape contribue à la création de préparations homogènes plus faciles à étudier et à contrôler du point de vue de la formation des différentes espèces dans la voie d'agrégation de A β 42. Une fois l'homogénéisation accomplie, l'addition de solutions salines aqueuses à pH contrôlé, tels que les tampons, va déclencher la formation des différentes formes reconnues comme des agrégats du peptide amyloïde (Shen *et al*, 1995 ; Stine *et al*, 2003 ; Yamamoto *et al*, 2004 ; Barghorn *et al*, 2005 ; Lee *et al*, 2006 ; Wang *et al*, 2006 ; Bartolini *et al*, 2007 ; Gellermann *et al*, 2007 ; Jan *et al*, 2010).

Afin d'obtenir des préparations monomériques de A β 42 stables, qui puissent être utilisées pour les différentes manipulations, le protocole proposé par Ryan et collaborateurs (2010) a été suivi avec quelques modifications. Le peptide A β 42 synthétique (*EZ Biolab*) a été d'abord solubilisé en utilisant le solvant organique 1,1,1,3,3,3 hexafluorure-2-propanol (ou hexafluorure d'isopropanol HFIP, Fluka) à une concentration finale du peptide de 1 mM. Les échantillons ont été mélangés jusqu'à l'obtention des solutions homogènes et aliquotés ensuite dans des microtubes, à raison de 20 μ l de solution par tube, et séchées sous une atmosphère d'azote. Les aliquotes séchées ont été conservés à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation.

5.5.- Obtention des oligomères d'A β 42

Pour la formation des oligomères, les aliquotes du peptide séché sont d'abord résuspendus, à une concentration finale de 5 mM, dans du DMSO (Sigma-Aldrich). Cette solution est ensuite soniquée dans un bain pendant 10 minutes, diluée à une concentration finale de 100 μ M dans du tampon PBS (pH 7,3) avec 0,05% SDS et vortexée pendant 30 secondes. Finalement, l'échantillon est dilué à une concentration de 20 μ M avec du PBS. Afin de suivre la cinétique d'agrégation du peptide par électrophorèse, la solution contenant le peptide est incubée dans un bain à 37°C pendant 72 heures, au cours desquelles des aliquotes de 30 μ l sont prélevés à différents temps d'incubation et congelés à -20 °C. Comme contrôle d'agrégation, un autre essai a été fait dans les mêmes conditions à l'exception de l'addition du SDS comme déclencheur du processus.

5.6.- Electrophorèse en gels de polyacrylamide en présence de dodecylsulfate de sodium (SDS-PAGE)

Dans ce travail, la séparation par électrophorèse des différents agrégats de A β 42 a été réalisée dans des gels de 12% de polyacrylamide contenant, dans sa partie supérieure, un gel

de 5% de polyacrylamide. L'électrophorèse a été réalisée dans un système de migration verticale *Electro-Eluter* modèle 422 (BioRad). Les échantillons ainsi que les témoins de poids moléculaire (*Mark12TM Unstained Standard*, Invitrogen Cat n° LC5677) ont été dilués avec du tampon de dépôt avant d'être placés dans les puits du gel 5% de polyacrylamide (volume final par puits : 10 µl). La migration a été faite dans le tampon adéquat (tampon de migration) pendant 80 minutes sous un voltage de 150 Volt. La composition des gels et des solutions utilisés est indiquée ci-dessous :

Gel concentrateur 5%	40% acrylamide/bis-acrylamide (19:1) ; 1,5 M Tris (pH 8,8) ; 10% (v/v) SDS ; 10% persulfate d'ammonium ; 0,001 % (v/v) TEMED
Gel de séparation 12%	40% acrylamide/bis-acrylamide (19:1) ; 1,5 M Tris (pH 6,8) ; 10% (v/v) SDS ; 10% persulfate d'ammonium ; 0,001 % (v/v) TEMED
Tampon de dépôt (4X)	125 mM Tris (pH 6,8); 2,5% (v/v) SDS ; 25% (v/v) β-mercaptoéthanol ; 25% (v/v) glycérol ; 0,004% bleu de bromophénol
Tampon de migration (10X)	0,25 M Tris ; 2 M Glycine ; 1% SDS (volume final 1 L)

5.7.- Détection des protéines séparées par électrophorèse par coloration utilisant le nitrate d'argent

Actuellement, il existe de nombreux protocoles pour faire la coloration. Tous ces protocoles sont proposés à partir du travail pionnier de Rabilloud et collaborateurs (1988) dont les grandes lignes ont été suivies dans ce travail, mais aussi certaines modifications afin d'améliorer les résultats obtenus (protocole proposé par Chevallet et collaborateurs en 2006). Dans ce contexte, le protocole comprend 5 étapes basiques : i) fixation des protéines au gel, ii) sensibilisation pour augmenter la réactivité et le contraste de la coloration, iii) réaction des protéines fixées avec une solution de nitrate d'argent, iv) développement de la coloration pour

obtenir l'image contrastée et v) arrêt de la réaction afin d'éviter un contraste excessif et pour rincer les ions d'argent non précipités autour des protéines.

Cette technique, utilisée en complément avec l'électrophorèse en gels de polyacrylamide, permet de visualiser les différents intermédiaires de la voie d'agrégation du peptide amyloïde solubilisé dans les conditions déjà décrites et qui peuvent se distinguer en fonction de leur taille (poids moléculaire).

La composition des solutions utilisées est la suivante :

Solution de fixation des protéines	30% (v/v) méthanol ; 5% (v/v) acide acétique dans H ₂ O ultra pure (volume final 150 ml)
Solution de réaction de sensibilisation	0,02% (v/v) thiosulfate de sodium dans H ₂ O ultra pure (volume final 50 ml)
Solution de réaction des protéines avec l'argent	11,8 mM nitrate d'argent ; 37% (v/v) formaldéhyde dans H ₂ O ultra pure (volume final 50 ml)
Solution de révélation	226 mM carbonate de sodium ; 10% (v/v) thiosulfate de sodium ; 37% (v/v) formaldéhyde dans H ₂ O ultra pure (volume final 50 ml)
Solution d'arrêt de la coloration	330 mM Tris ; 0,02% (v/v) acide acétique dans H ₂ O ultra pure (volume final 50 ml)

Un schéma descriptif du protocole suivi pour la coloration des gels est montré dans la Figure 27.

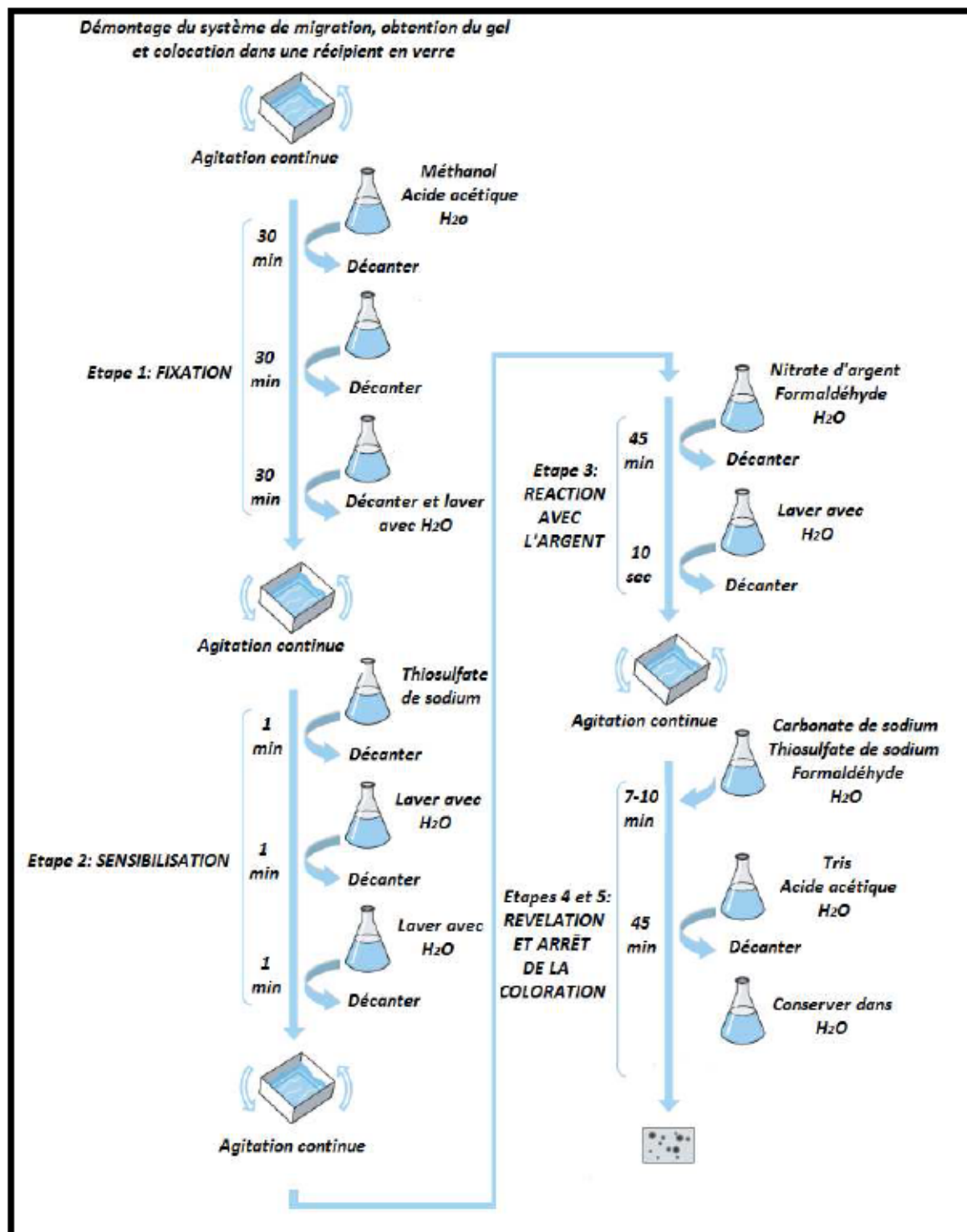


Figure 27: Protocole utilisé pour la coloration des gels avec le nitrate d'argent

5.8.- Préparation des vésicules de membranes de cellules K562/ADR

La préparation de membranes est une méthodologie qui était couramment utilisée afin de réaliser des études de transport bien avant la description des transporteurs ABC. La cellule étant un système très complexe, le but est de la « vider » de toutes les structures et organites intérieurs pour avoir uniquement des membranes « enrichies » du transporteur objet de l'étude. Cependant, ce n'est qu'en 1970 qu'un protocole pour l'obtention de vésicules de membrane en utilisant différentes étapes de centrifugation comportant des temps et des vitesses de rotation variés ainsi qu'une phase de séparation dans des solutions denses a été établi (Steck *et al*, 1970). Depuis, de nombreuses variantes méthodologiques d'obtention des vésicules de membrane ont été proposées, en fonction des types cellulaires utilisés. Avec l'identification de la P-gp comme le principal responsable du phénotype MDR, des études de plusieurs molécules pouvant être substrats de cette protéine ont été identifiées à l'aide des préparations de vésicules de membrane.

Les vésicules de membranes de cellules K562/ADR ont été préparées suivant le protocole proposé par Garrigos et collaborateurs en 1993 (Garrigos *et al*, 1993) avec quelques modifications faites en fonction de la lignée cellulaire utilisée. Les solutions utilisées sont listées ci dessus

Tampon Hypotonique	10 mM Tris-HCl (pH 7,8) ; 10 mM KCl ; 2 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT ; 1 mM EGTA
Solution de Saccharose	46% p/v saccharose dans tampon hypotonique
Tampon A	10 mM Tris-HCl (pH 7,8) ; 10 mM KCl ; 2 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT ; 1 mM EGTA ; 100 mM NaCl

Un schéma descriptif du protocole suivi pour la préparation de vésicules de membranes des cellules K562/ADR est présenté dans la Figure 28.

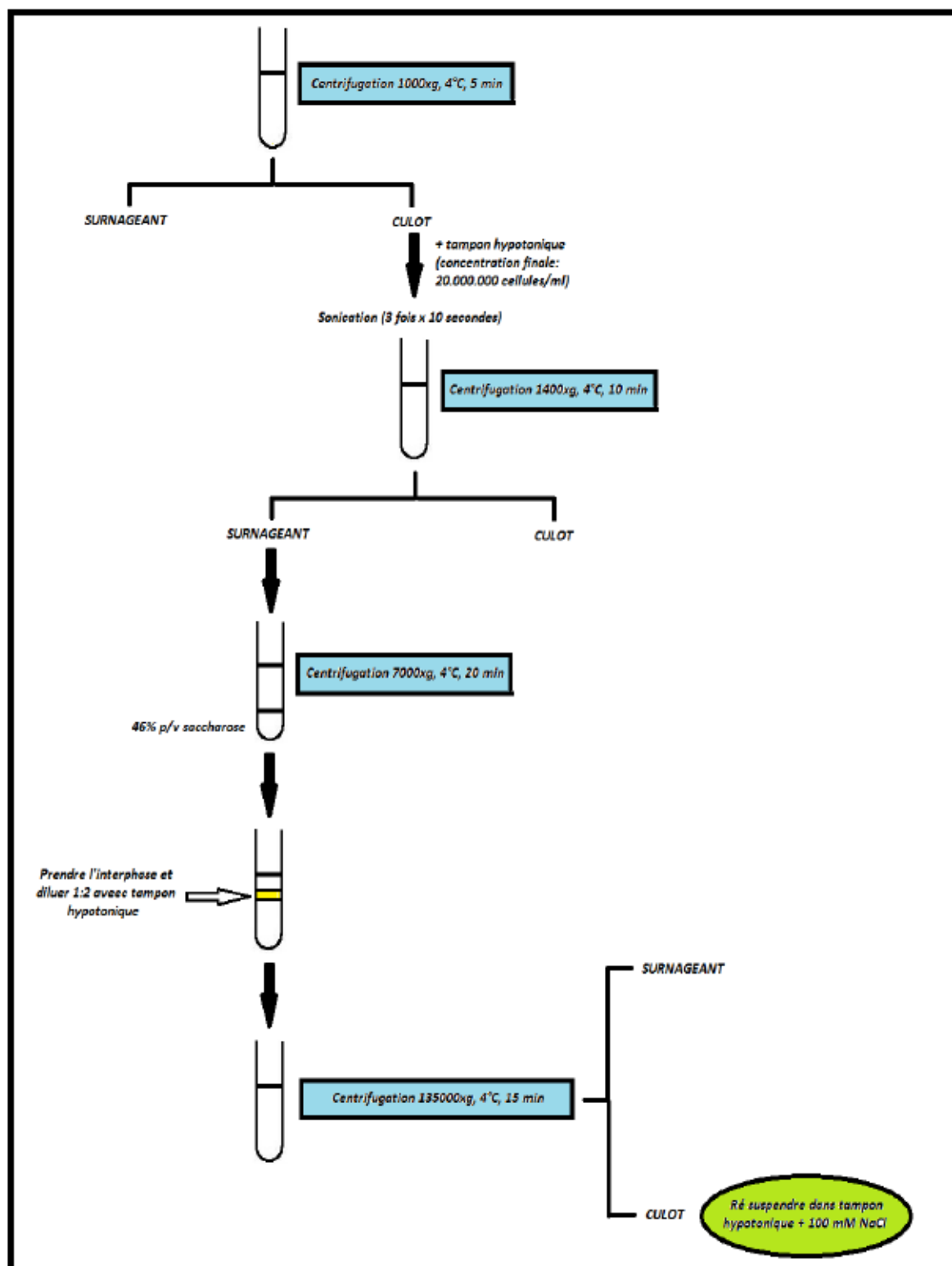


Figure 28. Schéma du protocole utilisé pour la préparation de vésicules de membranes de cellules K562/ADR

5.9.- Détermination de la concentration de protéines par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford a été utilisée afin de quantifier la concentration des protéines dans des préparations de vésicules de membrane des cellules K562/ADR.

Les mesures ont été réalisées selon les instructions générales proposées dans le manuel du kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay* acheté chez BioRad. Des gammes, d'étalonnage avec des concentrations entre 0 et 10 µg/ml de BSA, ont été réalisées à partir d'une solution standard 0,1 mg/ml BSA. Les mesures ont été obtenues en utilisant un spectrophotomètre d'absorption électronique à une longueur d'onde $\lambda = 595$ nm. Le volume final de chaque échantillon était de 1 ml.

5.10.- Détermination de l'activité ATPase de la P-gp dans des vésicules de membrane

La P-gp transporte ses substrats à travers la membrane plasmique contre le gradient de concentration du substrat, en utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. La réaction d'hydrolyse de l'ATP donne lieu à l'apparition de phosphate inorganique (Pi).

Depuis plusieurs années, de nombreuses méthodes pour la détection de Pi ont été développées et optimisées; l'une des plus classiques consiste à utiliser l'Heptamolybdate d'Ammonium dans un milieu acide en présence d'un agent réducteur. Cependant, une modification de cette méthode classique a été utilisée (Bartolommei *et al*, 2013). Le tartrate de Potassium et d'Antimonium (III) réagit avec l'Heptamolybdate d'Ammonium dans un milieu acidifié (H₂SO₄); donnant lieu à la formation d'un complexe d'Antimoine-Phosphomolybdate. En présence d'un agent réducteur (acide Ascorbique), ce complexe est

d'une couleur bleue intense, proportionnelle à la quantité de phosphate présente dans l'échantillon avec un pic d'absorption maximale à 880 nm.

Les solutions nécessaires pour l'essai enzymatique sont listées ci-dessus ; les concentrations finales sont également indiquées :

Cofacteur	1 mM ATP, préparé dans l'eau déionisée
Vésicules de membrane	Préparation des vésicules de membranes de cellules K562/ADR
Solution tampon de réaction (Sarkadi <i>et al</i>, 1992):	50 mM Tris ; 2 mM EGTA ; 2 mM DTT ; 50 mM KCl ; 0,5 mM Ouabaine ; 5 mM NaN ₃ (pH = 6,8)
Solution de détection du Pi (Bartolommei <i>et al</i>, 2013)	125 mM H ₂ SO ₄ ; 0,5 mM Heptamolybdate d'Ammonium ; 10 mM Acide Ascorbique ; 40 µM Tartrate de Potassium et d'Antimoine (III)
Inhibiteur de l'activité ATPase	Ortho vanadate de sodium (Na ₃ VO ₄ , préparé d'après les indications de Goodno, 1982)
SDS	Solution 5% SDS dans l'eau déionisée

Pour la détermination de l'activité ATPase, deux étapes ont été suivies :

1. **L'Etape 1** est la réaction d'hydrolyse de l'ATP: les vésicules de membrane plasmique (30 µg de protéines) sont incubées dans la solution tampon de réaction (50 mM Tris, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 50 mM KCl, 0,5 mM Ouabaine, 5 mM NaN₃ (pH = 6,8)) et l'hydrolyse d'ATP est déclenchée avec l'addition de MgATP à une concentration finale 1 mM. Ces mélanges sont, placés sous agitation, dans un bain à 37° C pendant 60 minutes.

2. **L'étape 2** est la réaction de détermination de la quantité de phosphate inorganique produit par l'hydrolyse de l'ATP : 100 µl d'une solution 5% SDS sont ajoutés à 100 µl de chaque mélange de réaction de l'étape 1 afin d'arrêter l'hydrolyse de l'ATP. Ensuite, 800 µl de la solution de détection du Pi sont ajoutés. Les échantillons sont mis sous agitation à température ambiante pendant 60 minutes. Les mesures conduisant à quantifier la production de Pi ont été faites en utilisant un spectrophotomètre d'absorption électronique à une longueur d'onde $\lambda = 880$ nm. Le volume final de chaque échantillon était de 1 ml. Des gammes d'étalonnage entre 0 – 100 nM Pi avec des solutions standards de KH_2PO_4 ont été aussi réalisées lors de chaque expérience afin d'avoir une relation entre les valeurs de densité optique à 880 nm de chaque réaction et la concentration de Pi.

Dans tous les cas, les expériences ont été réalisées avec un $n \geq 4$ et les résultats montrés sous la forme Moyenne \pm Déviation Standard.

5.11.- Mesure de la vitesse d'efflux d'une anthracycline par la P-gp.

La démarche suivie pour ces expériences est la suivante : les cellules K562/ADR sont d'abord centrifugées et le milieu de culture remplacé par le tampon Hepes/ Na^+ afin d'obtenir 1×10^6 cellules / ml. Les cellules en suspension sont ensuite placées, en absence de glucose, dans une cuve de quartz de 1 cm^2 de section en présence de 5 mM d'azoture de sodium (NaN_3). Les cuves sont placées dans un compartiment du spectrofluorimètre sous agitation, à 37°C pendant 30 minutes. L'azoture de sodium NaN_3 est un inhibiteur connu du complexe IV de la chaîne mitochondriale de transport des électrons conduisant à la synthèse d'ATP. Dans ce qui suit ces conditions seront qualifiées de « sans énergie ».

La Pirarubicine à une concentration finale de 1 μM est ajoutée à cette solution. Dans ces conditions, le signal fluorescent est F_0 et l'incorporation de la Pirarubicine dans la cellule est suivie par la diminution de son signal de fluorescence (F) à 590 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 480$ nm). Les cuves sont conservées dans les mêmes conditions de température et agitation pendant 30 minutes.

A l'état stationnaire, en présence de NaN_3 , la concentration globale de pirarubicine intercalée entre les paires de base de l'ADN dans le noyau est $C'_n = C_T (F_0 - F'_n)/F_0$, où F'_n est la fluorescence à l'état stationnaire (Fig. 8). Le peptide A β 42, à des concentrations comprises entre 0 et 2 μM , est additionné à la solution ainsi que du glucose à une concentration finale de 5 mM pour réactiver la synthèse d'ATP via la glycolyse et ainsi activer l'efflux de la Pirarubicine par la P-gp. Effectivement, on peut observer que 1 à 2 min après l'addition de glucose, une augmentation progressive du signal fluorescent en fonction du temps est observée. La pente, dF/dt , de la tangente à cette courbe peut être directement reliée à la vitesse d'efflux via le transporteur. Une fois atteint le nouvel état stationnaire, la valeur du signal fluorescent est F_n et la concentration globale de Pirarubicine intercalée dans le noyau est C_n .

L'addition de Triton X-100, qui perméabilise les membranes cellulaires, amène à un état d'équilibre où la concentration globale de Pirarubicine intercalée entre les paires de base dans le noyau est $C_N = C_T (F_0 - F_N)/F_0$.

D'après ces données expérimentales, dont un spectre type est montré dans la section Résultats et discussion (chapitre 6), les vitesses d'efflux de la Pira sont calculées et comparées afin de connaître si celle-ci est modulée par la présence de A β 42 par rapport aux cellules incubées dans les mêmes conditions sauf l'addition du peptide.

5.12. Mesure de la toxicité du peptide A β 42

5.12.1 - Essais de toxicité du peptide A β 42 dans les lignées cellulaires K562, K562/ADR et SH-SY5Y

Le bleu de Trypan est une des molécules les plus utilisées pour vérifier la viabilité cellulaire, en raison de son faible coût et de son efficacité. Dans ces « essais d'exclusion », proposés pour la première fois par Pappenheimer (1917), les cellules sont mises en présence du bleu de trypan, celui-ci a tendance à traverser les membranes plasmiques et en même temps à être efflué grâce à des mécanismes dépendant de l'ATP. Si la membrane est endommagée, les mécanismes d'efflux de la molécule ne fonctionnent pas et le bleu de Trypan s'accumule dans la cellule qui se colore en bleu. Au contraire si la membrane plasmique est intacte, le bleu de trypan ne pourra pas s'accumuler. Dans le premier cas, les cellules ne sont plus viables et dans le deuxième cas elles le sont encore.

Les essais d'exclusion du bleu de Trypan ont permis de vérifier la toxicité des préparations du peptide A β 42 sur les différentes lignées cellulaires utilisées. Ces essais ont été réalisés dans des plaques de 96 puits. Un schéma montrant le protocole détaillé est présenté dans la Figure 29. Pour chaque lignée cellulaire, les tests ont été faits avec un $n \geq 4$ et trois répliques par essai pour chaque concentration testée du peptide et du solvant utilisé pour la solubilisation du peptide A β 42.

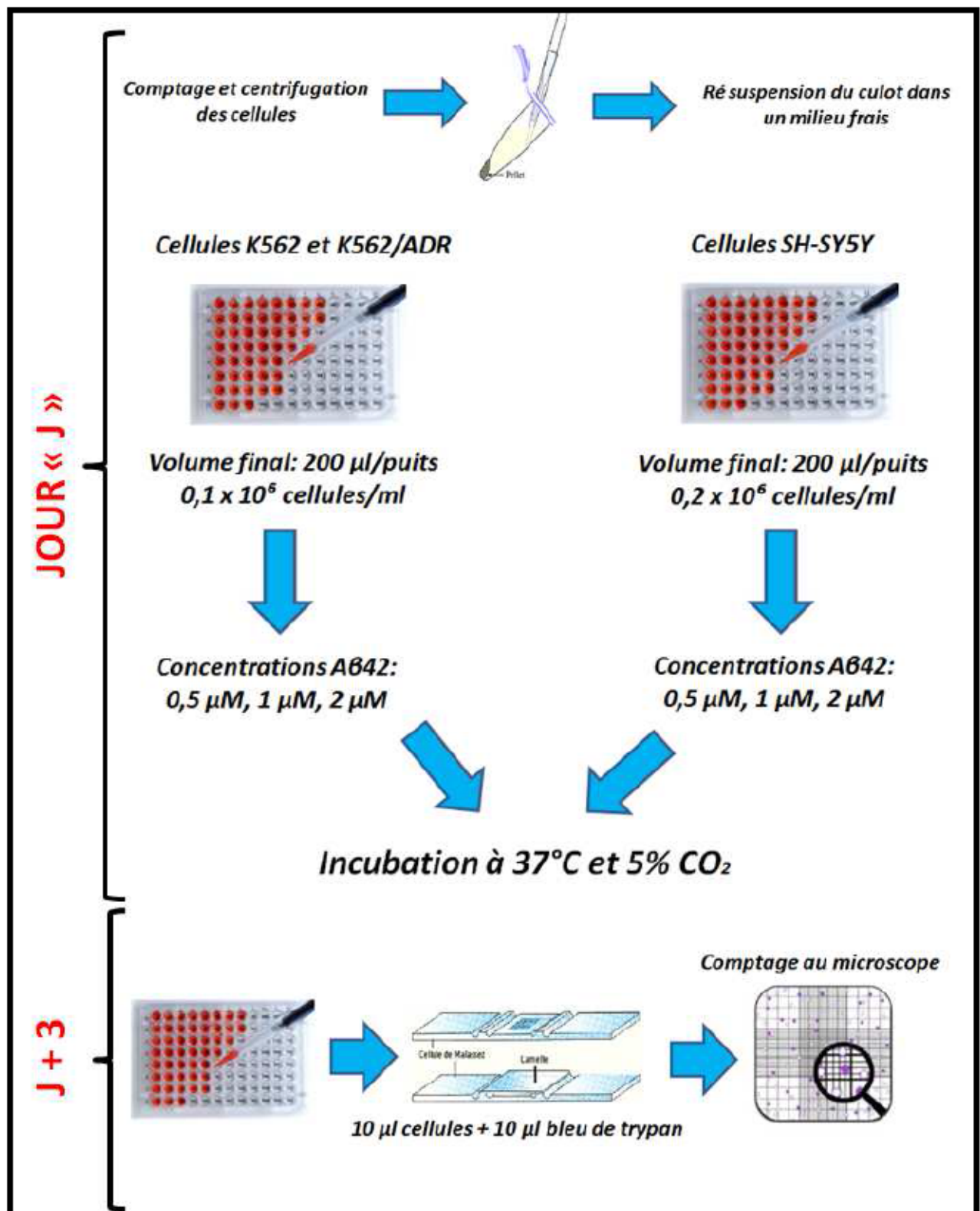


Figure 29. Protocole suivi pour les essais de toxicité du peptide A β 42 sur les lignées cellulaires K562, K562/ADR et SH-SY5Y

5.12.2.- Détermination de la concentration intracellulaire de Chlorure (Cl^-)

Les mesures de la concentration intracellulaire de Chlorure (Cl^-) ont été effectuées à l'aide de la sonde fluorescente MQAE dans la lignée cellulaire SH-SY5Y en présence et en absence d'A β 42.

Solutions utilisées

Tampon Hepes/Na^+	132 mM NaCl ; 3,5 mM KCl ; 1 mM CaCl_2 ; 0,5 mM MgCl_2 ; 20 mM Hepes (pH = 7,4). Dans ce tampon, les concentrations finales de chlorure et de gluconate sont: $[\text{Cl}^-] = 138,5$ mM ; $[\text{Gluconate}] = 0$ mM
Tampon Gluconate	132 mM Gluconate de Sodium; 3,5 mM Gluconate de Potassium; 1 mM CaCl_2 ; 0,5 mM MgCl_2 ; 20 mM Hepes (pH = 7,4). Dans ce tampon, les concentrations finales de chlorure et du gluconate sont: $[\text{Cl}^-] = 3$ mM ; $[\text{Gluconate}] = 135,5$ mM
Sonde fluorescente MQAE	Solution stock 100 mM préparée dans H_2O déionisée

Un schéma illustrant le procédé est montré dans la figure 30. Les solutions tampons numérotées 1, 2, 3... 12 ont été préparées à partir des tampons Hepes/ Na^+ et Gluconate, mélangés en différentes proportions afin d'avoir les concentrations finales croissantes de Chlorure (voir tableau III).

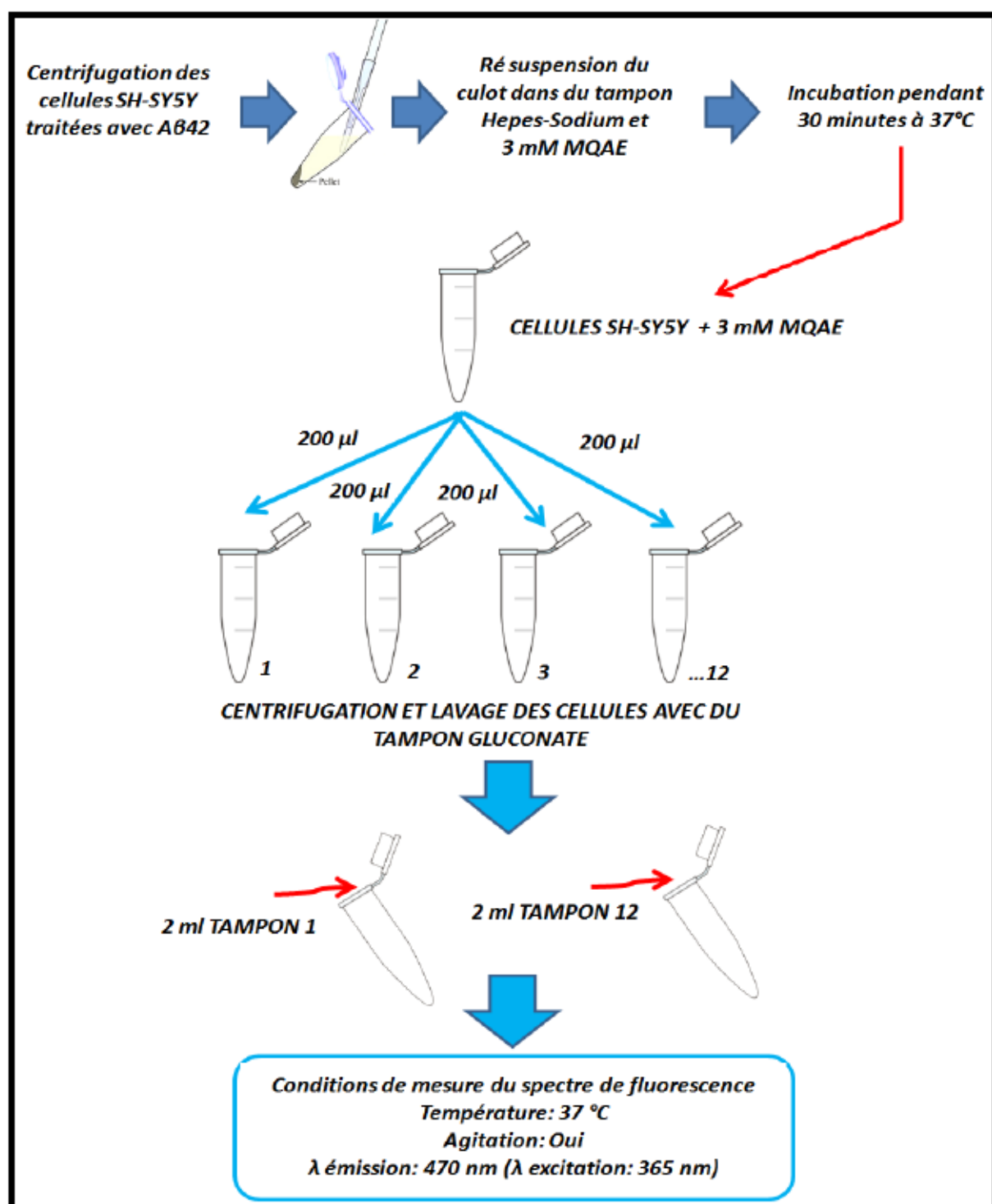


Figure 30. Protocole suivi pour la détermination de la concentration intracellulaire de chlorure dans les cellules SH-SY5Y

Tableau III. Liste de tampons utilisés pour la détermination de la concentration intracellulaire de chlorure dans les cellules SH-SY5Y. Les variations des concentrations finales de chlorure et de gluconate sont indiquées.

Tampon	[Cl ⁻] (mM)	[Gluconate] (mM)
1	3	135,5
2	6,9	128,6
3	13,8	121,7
4	20,8	114,7
5	27,7	107,8
6	34,6	100,9
7	41,5	94
8	48,5	87
9	55,4	80,1
10	69,2	66,3
11	83,1	52,4
12	97	38,5

5.12.3. - Mesure du potentiel de membrane mitochondriale (Ψ_{mit}) des cellules SH-SY5Y en présence et en absence du peptide A β 42

La Tetramethylrhodamine (TMR) est un cation lipophile fluorescent qui s'accumule à l'intérieur des cellules, plus particulièrement dans la mitochondrie en fonction du potentiel membranaire. Pour chaque expérience, 3 flacons de culture ont étéensemencés à $0,4 \times 10^6$ cellules/mL et cultivés pendant 72 heures à 37°C et 5 % de CO₂ : 1 flacon de cellules SH-SY5Y sans traitement, 1 flacon de cellules traitées par le mélange permettant de solubiliser le peptide A β 42, et 1 flacon de cellules traitées avec 0,5 μ M du peptide A β 42. Le jour de la mesure du potentiel membranaire, les cellules de chaque groupe sont centrifugées et suspendues dans du tampon HEPES-Na⁺ à 2×10^6 cellules/mL. De chaque suspension, 2 mL sont prélevés et mis dans une cuve en quartz sous agitation magnétique à 37°C dans le spectrofluorimètre. Puis un aliquote d'une solution de TMR est ajoutée de façon à avoir une concentration finale 0,5 μ M. Après 200 s on ajoute du triton X-100 (4%) afin de

perméabiliser les membranes. La variation du signal de fluorescence en fonction du temps est suivie à 573 nm (longueur d'onde d'excitation de 543 nm).

□

□

□

□

Chapitre 6 : Résultats et Discussion

6.1.- Préparation des solutions du peptide A β 42 et étude de son agrégation en fonction du temps

Pour la première étape de cette thèse, des études *in vitro* se sont avérées nécessaires afin de définir les conditions de solubilisation et d'agrégation du peptide A β 42. Cette étude nous a permis de préparer des populations structuralement homogènes, aspect indispensable en raison de la variabilité existant entre des lots de peptides synthétiques chimiquement identiques et les différentes conditions de solubilisation pouvant être employées. Environ six mois ont été nécessaires pour trouver les conditions « idéales » de solubilisation du peptide ainsi que leur reproductibilité dans le temps. Dans ce contexte, plusieurs méthodes de solubilisation puis des vérifications postérieures des formes contenues dans les préparations ont été testées. La méthode proposée par Ryan et collaborateurs en 2010 (Ryan *et al*, 2010), avec quelques modifications apportées en fonction de notre peptide, nous a permis d'avoir des préparations stables et homogènes pouvant servir de point de départ aux études cinétiques d'agrégation et d'induction de la toxicité sur différentes lignées cellulaires.

Une élimination des formes agrégées pouvant être présentes dans les solutions du peptide A β 42 synthétique est essentielle avant d'entamer l'étude cinétique de son agrégation. De nombreux solvants organiques sont censés faciliter cette tâche, notamment les alcools contenant un atome de fluor dans leur structure, tels que le 1,1,1,3,3,3-hexafluorure-2-propanol (HFIP) et le 2,2,2-Trifluoroéthanol (TFE). Une première solubilisation du peptide avec HFIP permet de rompre les conformations du type feuillet plissé β caractéristiques des formes agrégées du peptide A β 42 tout en promouvant la formation de la structure secondaire de type hélice alpha (Bhattacharjya *et al*, 1999 ; Crescenzi *et al*, 2002). Cependant, le HFIP étant un alcool fortement corrosif, une élimination via évaporation sous atmosphère d'azote a été obligatoire afin de rendre les préparations compatibles avec les essais développés au

niveau cellulaire. Une fois cette partie réalisée, l'utilisation du DMSO (solvant employé couramment pour la solubilisation des peptides) permet « d'effacer » le passé d'agrégation du peptide synthétique (Arakawa *et al*, 2011).

La figure 31A montre une cinétique d'agrégation de solutions de A β 42 préparées de la façon décrite dans la section 5.5, incubées à 37°C pendant 72 heures et suivies par électrophorèse dans des gels 12% polyacrylamide. Dans ces conditions on observe, au temps 0, l'absence des formes agrégées après le traitement avec les deux solvants organiques mentionnés et la prédominance des formes monomériques (d'un poids moléculaire de 4,5 kDa) coexistant avec des formes dimériques/trimériques. Lorsque le processus d'agrégation commence à se mettre en place, une diminution de l'intensité des bandes correspondant aux formes monomériques est évidente à 48 et 72 heures d'incubation. Ce phénomène est concomitant avec l'apparition des bandes correspondantes à des formes de taille plus grande (36-66 kDa) entre les 24 et les 72 heures d'incubation. Ces formes correspondent à des oligomères. L'observation de ces bandes est liée non seulement à l'incubation des préparations dans un milieu aqueux (tampon PBS) mais aussi à la présence du détergent SDS agissant comme un inducteur de l'agrégation. Dans nos conditions expérimentales, la présence de ce détergent a été nécessaire pour observer la conversion des formes monomères à oligomères. Cela est confirmé en réalisant la cinétique d'agrégation dans les mêmes conditions de solubilisation et d'incubation du peptide mais en absence de SDS (figure 31B). La confrontation de ces résultats à ceux existants dans la littérature comportant une nomenclature des différentes formes d'A β (voir tableau I, page 35), nous a permis d'identifier les bandes observées comme des formes d'oligomères solubles et stables dans le SDS (Ryan *et al*, 2010 ; Yamamoto *et al*, 2004).

L'analyse de l'ensemble des résultats montre qu'avec les étapes de solubilisation suivies, le peptide initialement dans une forme non agrégée évolue après environ 24 heures, en présence de SDS, vers des formes agrégées.

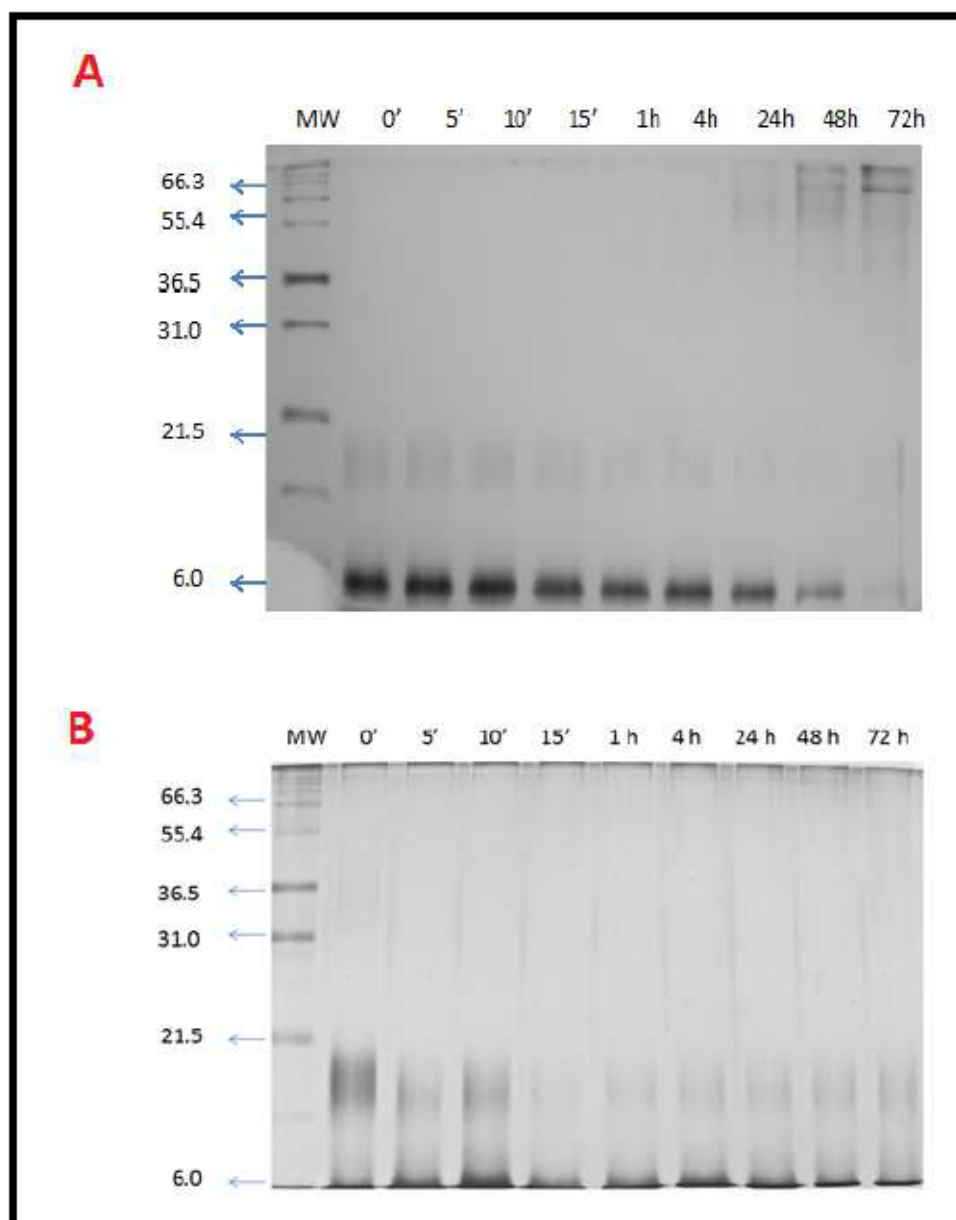


Figure 31. Cinétiques d'agrégation du peptide $A\beta_{42}$. Des aliquotes des solutions des peptides $A\beta_{42}$ préparées de la façon décrite dans la section 6.5 ont été prélevés à différents temps (0, 5, 10 et 15 minutes ; puis 1, 2, 4, 24, 48, 72 heures) et placés dans des gels 12% polyacrylamide afin de visualiser les formes présentes à chaque temps d'incubation. Les poids moléculaires ont été calculés à l'aide des témoins (ligne MW). La figure A montre une cinétique des solutions d' $A\beta_{42}$ où le SDS est inclus dans les préparations afin de déclencher l'agrégation, tandis que dans la figure B ce détergent n'est pas utilisé dans les préparations.

6.2.- Effet de A β 42 sur l'activité ATPase de la P-gp dans des vésicules de membrane des cellules K562/ADR

L'activité ATPase de la P-gp présente dans des vésicules de membranes a été mesurée en présence de différentes concentrations de A β 42 (0 – 10 μ M) afin de déterminer s'il y avait ou non stimulation de cette activité. Rappelons que la stimulation de l'activité ATPase de la P-gp par une molécule (M) est considérée comme un critère nécessaire pour que cette molécule puisse être envisagée comme substrat de la P-gp. Afin d'attribuer l'activité ATPase mesurée lors des essais à la P-gp, des inhibiteurs d'autres ATPases présentes communément dans les membranes ont été utilisés. Les mesures ont été réalisées en mesurant la concentration de Pi produit lors de l'hydrolyse d'ATP (voir section 5.10). Par ailleurs, l'effet du solvant du peptide, sur l'activité ATPase a également été testé. Les résultats sont présentés dans la figure 32A (■). Un effet du peptide A β 42 sur l'activité ATPase de la P-gp a été observé pour toutes concentrations testées. Dans tous les cas, cet effet était stimulateur puisque l'activité déterminée a été supérieure à l'activité basale. D'ailleurs, un plateau est observé à des concentrations entre 2 et 10 μ M. Considérant le milieu où les solutions du peptide ont été préparées, une série similaire d'expériences a été effectuée en présence de différents volumes du mélange de solvants employé pendant la préparation des solutions de A β 42. Ces volumes étaient équivalents à ceux utilisés pour arriver aux différentes concentrations du peptide. Le même effet stimulateur a été observé lors des essais avec les solvants (Figure 32A, (□)). Si la soustraction des deux courbes est réalisée, la non stimulation de l'activité ATPase de la P-gp par le peptide A β 42 est observée (Figure 32A, (×)).

Parallèlement et systématiquement, nous avons vérifié que notre système « fonctionnait » correctement, à savoir que l'on pouvait observer une stimulation de l'activité

ATPase en présence d'une molécule qui est transportée par la P-gp. Pour ce faire nous avons choisi le vérapamil (Hodges *et al*, 2011 ; Teodori *et al*, 2011 ; Sharom, 2011).

Dans une première série d'expériences, des vésicules de membrane ont été incubées en présence de différentes concentrations de vérapamil (0 – 1000 μ M). Une courbe en forme de cloche a été obtenue (Figure 32B), montrant des faibles modifications de l'activité ATPase basale de la P-gp à des concentrations entre 0 et 1 μ M et une stimulation maximale de cette activité à une concentration de 5 μ M. Une diminution de l'activité ATPase basale en présence de vérapamil a été aussi observée à des concentrations supérieures à 5 μ M, montrant un effet inhibiteur du modulateur à des concentrations élevées.

Une deuxième série d'expériences a été réalisée, cette fois-ci en présence de différentes concentrations d'orthovanadate de sodium (0 – 1000 μ M), un inhibiteur de l'hydrolyse d'ATP (Urbatsch *et al*, 1995). Les résultats sont montrés dans la Figure 32C. Un effet inhibiteur de l'activité ATPase basale de la P-gp dépendant de la concentration d'orthovanadate a été observé ; avec 50% d'inhibition de l'hydrolyse de l'ATP à une concentration d'environ 10 μ M et une inhibition quasi complète à une concentration de 1000 μ M.

L'ensemble des résultats obtenus dans ces expériences montrant que le peptide A β 42 n'a aucun effet sur l'activité ATPase de la P-gp, met fortement en doute la possibilité que celui-ci puisse être un substrat de la P-gp. Cependant, d'autres expériences conçues pour renforcer ou non cette idée ont été réalisées et les résultats sont décrits dans les paragraphes suivants.

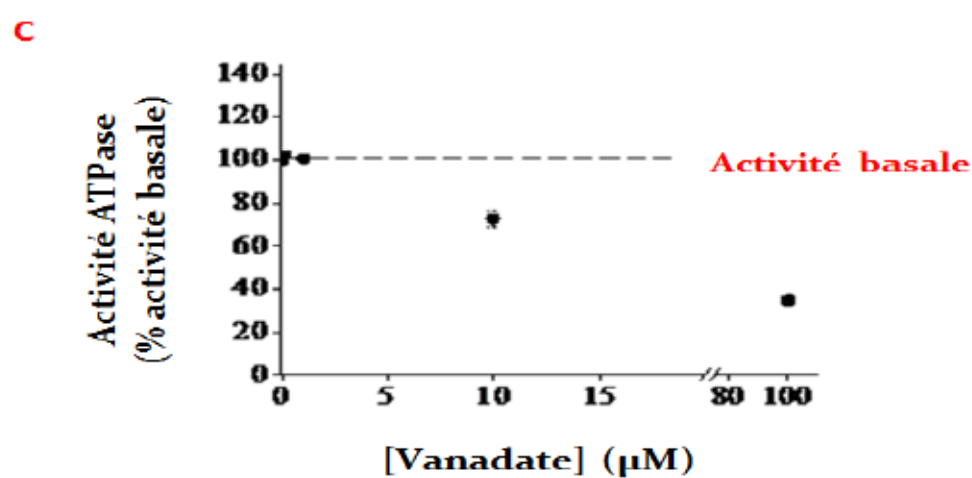
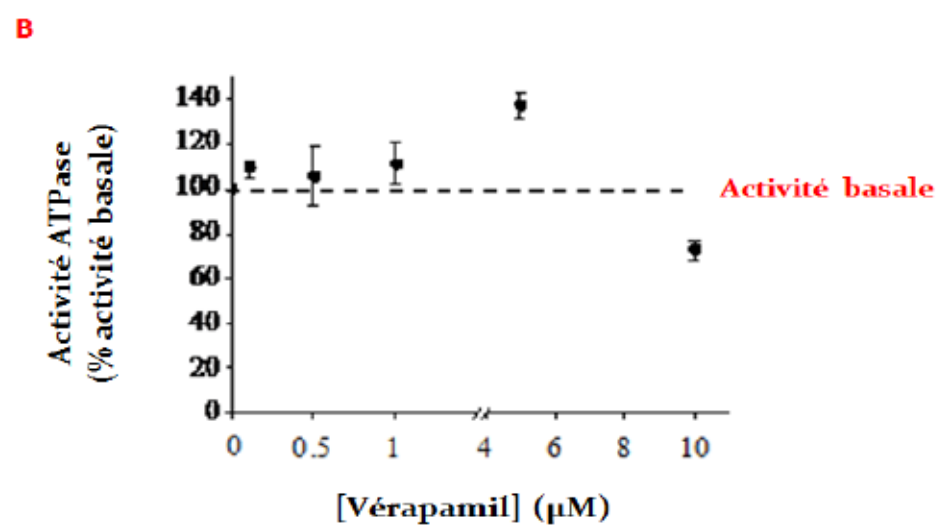
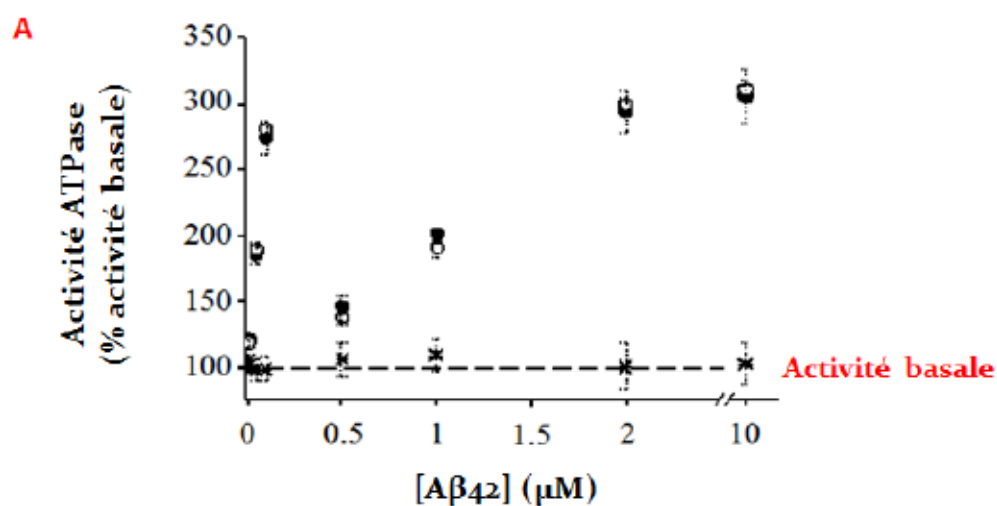


Figure 32. Modification de l'activité ATPase dans des vésicules de membrane K562/ADR en présence de différents modulateurs : A) Peptide A β 42 (■) et mélange des solvants utilisés pour la solubilisation du peptide (□). B) Vérapamil, substrat de la P-gp. C) Orthovanadate de sodium, un inhibiteur classique de l'activité ATPase.

6.3.- Effet du peptide A β 42 sur le transport de la Pirarubicine par la P-glycoprotéine dans les lignées cellulaires K562/ADR et hCMEC/D3

Bien que de nombreuses molécules soient considérées comme substrats de la P-gp, il n'y a que très peu d'études démontrant réellement le transport direct de ces molécules par cette protéine. Il existe cependant quelques « critères » devant être remplis établis par une molécule pour que celle-ci puisse être envisagée comme substrat de la P-gp.

Le transport des anthracyclines, des vinca alcaloïdes et du vérapamil par la P-gp a été démontré il y a plusieurs années. Il a également été montré que le transport des anthracyclines était perturbé entre autres par : i) les vinca alcaloïdes, le vérapamil et d'une façon générale par toute molécule étant elle-même substrat de la P-gp ; et ii) certaines molécules qui modifiaient la fluidité membranaire autour de ce transporteur (Mankhetkorn *et al*, 1998 et 1999 ; Borrel *et al*, 1994a et 1994b).

Afin de clarifier si A β 42 pouvait être un substrat de la P-gp, nous avons étudié son effet sur l'efflux de la Pirarubicine (molécule de la famille des anthracyclines et substrat de la P-gp) dans des cellules K562/ADR surexprimant la P-gp ainsi que dans des cellules endothéliales hCMEC/D3. Pour ce faire, nous avons mesuré « l'efflux actif » de la Pirarubicine en absence et en présence de A β 42.

Dans ce type d'expériences, les cellules ont été d'abord incubées en absence du glucose et en présence d'azote de sodium (NaN₃) afin de bloquer la synthèse d'ATP, nucléotide nécessaire au fonctionnement de la P-gp et l'efflux des molécules. La figure 33

montre le résultat d'une expérience type : l'addition de Pira à des cellules en suspension montre tout d'abord une augmentation instantanée de l'intensité du signal fluorescent correspondant à la Pira dans le milieu extracellulaire. On observe ensuite une diminution du signal due à l'intercalation de la Pira entre les paires de bases de l'ADN jusqu'à l'obtention d'un état stationnaire dans lequel la concentration intracellulaire de Pira dans le cytosol est égale à celle du milieu extracellulaire. L'intensité de fluorescence mesurée à 590 nm une fois atteint cet état stationnaire sera notée F_n' . L'addition de 5 mM de glucose restore la synthèse de l'ATP et le fonctionnement de la P-gp. On observe alors une augmentation du signal fluorescent correspondant au rejet de la Pira dans le milieu extracellulaire. C'est la valeur de la pente de la tangente à la courbe dF/dt qui permet de calculer la vitesse d'efflux de l'anthracycline sous l'effet de la P-gp.

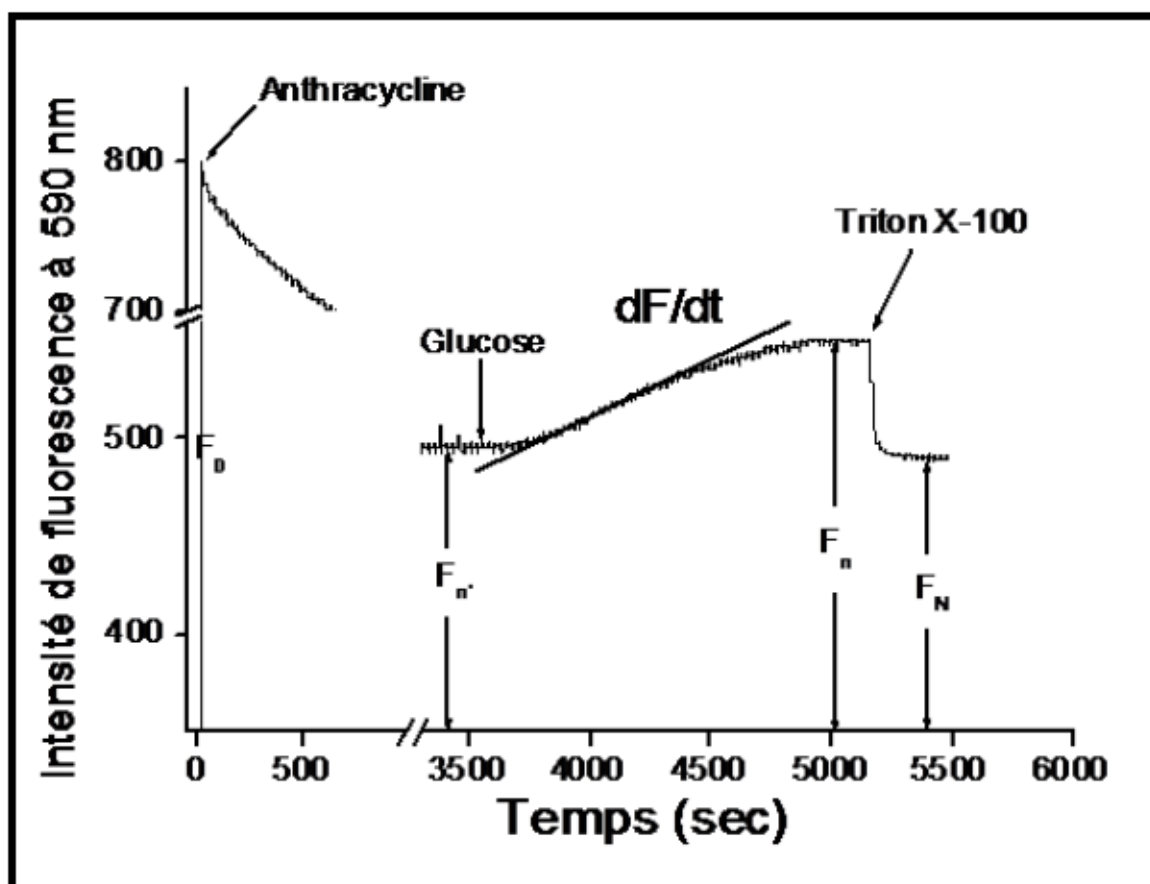


Figure 33. Cinétique d'incorporation de la Pirarubicine dans des cellules K562/ADR en fonction du temps

Une expérience similaire effectuée avec des cellules K562, ne sur-exprimant pas la P-gp, ne montre aucun effet du glucose (Figure 34, courbe « c »).

Une deuxième série d'expériences a été effectuée mais cette fois-ci en présence du vérapamil (concentration finale de 1 μ M), ajouté avant l'addition du glucose. Dans ce cas, l'efflux de la Pira diminue (figure 34, courbe « b »).

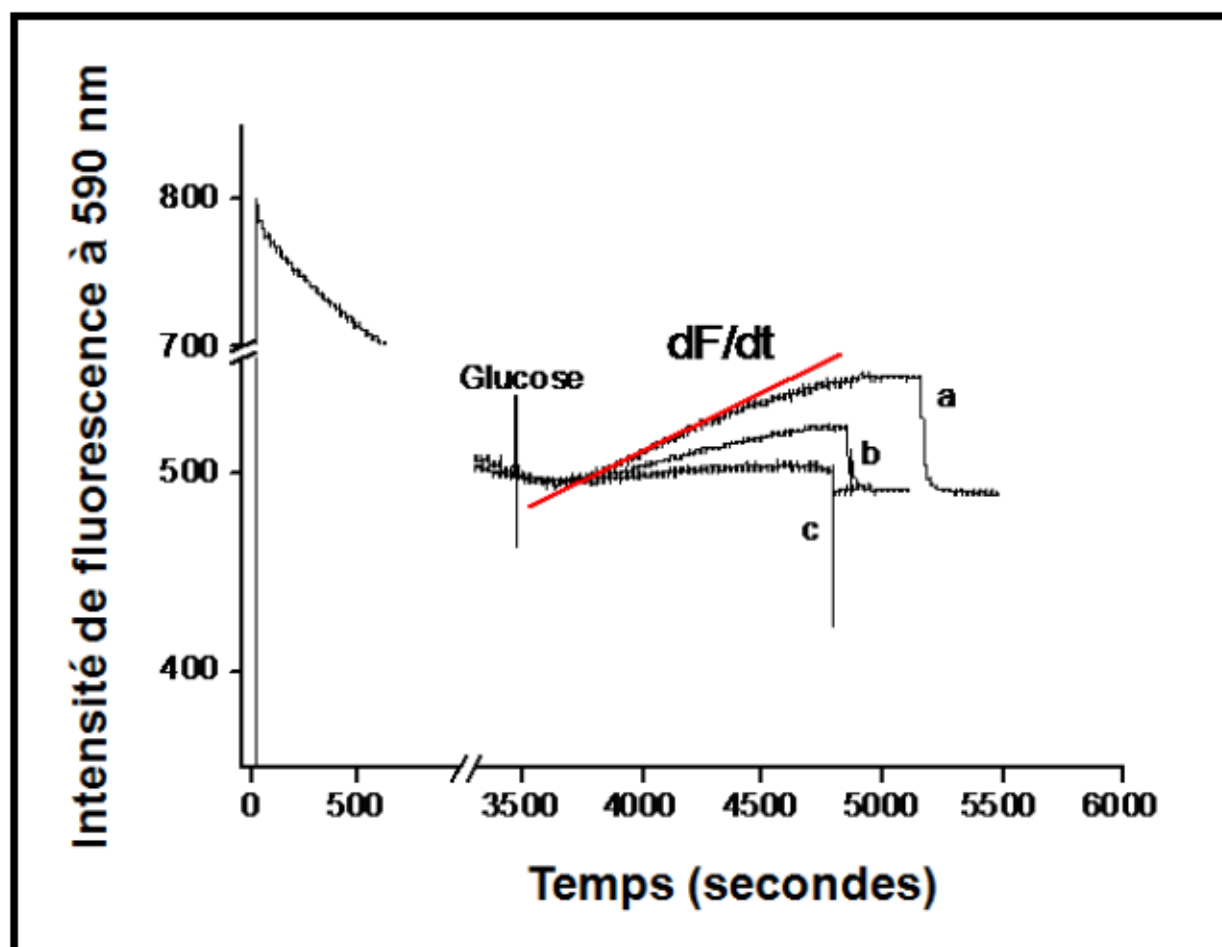


Figure 34. Cinétique d'incorporation de la Pirarubicine dans des cellules K562 et K562/ADR en fonction du temps. Dans une expérience type, 10^6 cellules/ml sont incubées en présence de NaN_3 et ensuite de pirarubicine. L'extinction du signal fluorescent est mesurée à 590 nm. Le signal fluorescent augmente en fonction du temps après l'addition du glucose (dF/dt), ceci dû à la réactivation de l'efflux de la pirarubicine par la P-gp. Des différences dans cette augmentation sont observées en fonction des lignées cellulaires et des traitements. Ainsi, on observe la majeure variation dF/dt dans des cellules K562/ADR contrôles (cinétique « a »), une variation plus atténuée dans des cellules K562/ADR en présence du vérapamil, un inhibiteur de la P-gp (cinétique « b ») ; et une variation presque nulle dans des cellules K562S ne surexprimant pas la P-gp (cinétique « c »)

Ces expériences ont été réalisées afin de bien montrer que dans nos conditions expérimentales, l'addition d'un substrat de la P-gp (vérapamil) inhibait le transport de la Pira par la P-gp.

Une troisième série d'expériences a été réalisée mais cette fois-ci avec $\text{A}\beta 42$ à des concentrations comprises entre 0 et 2 μM , ajoutées avant l'addition du glucose.

Le tableau IV (page 100) montre les rapports calculés à partir des données de vitesses d'efflux de la Pira en absence et en présence de différentes concentrations du peptide A β 42 lors de son incubation avec des cellules de la lignée K562/ADR. Quelque soit la concentration de A β 42 utilisée, l'analyse des résultats ne montrent pas de différences significatives. Par ailleurs, le même type d'expériences a été réalisé avec le solvant du peptide amyloïde et aucune variation de la vitesse d'efflux de la Pira n'a été observée.

Des conditions expérimentales similaires ont été aussi employées afin d'étudier ce phénomène dans la lignée cellulaire endothéliale hCMEC/D3 exprimant aussi la P-gp. Cependant, les niveaux d'expression du transporteur étant assez faibles, il n'a pas été possible d'obtenir une pente suffisamment forte pour calculer les vitesses d'efflux de l'antracycline.

Tableau IV. Rapport des vitesses d'efflux (Ve) de la Pirarubicine en présence et en absence de concentrations variables du peptide A β 42. Les résultats sont exprimés sous la forme : $Ve \pm$ Déviation Standard avec $n \geq 4$ dans tous les cas

[A β 42] (μ M)	Rapport des vitesses d'efflux de la Pirarubicine
	Ve avec A β 42 / Ve sans A β 42
0	1,00
0,01	0,88 \pm 0,12
0,05	0,88 \pm 0,12
0,1	0,84 \pm 0,04
0,5	1,02 \pm 0,11
1	0,89 \pm 0,12
2	0,96 \pm 0,13

6.4.- Toxicité du peptide A β 42

La toxicité des préparations du peptide A β 42 a été évaluée du point de vue de la mortalité induite dans différentes lignées cellulaires mais aussi par les modifications de certains paramètres physiologiques : variation de la concentration intracellulaire des ions Cl⁻ et du potentiel de la membrane mitochondriale.

6.4.1.- Evaluation des effets toxiques du peptide A β 42 dans les lignées cellulaires K562, K562/ADR et SH-SY5Y : survie cellulaire

L'étude des conditions et des temps d'incubation nécessaires à la préparation des solutions conduisant à la formation des formes oligomériques de A β 42 était motivé par les résultats récents suggérant que ces formes sont beaucoup plus toxiques que les formes monomères et fibrillaires.

Après trois jours d'incubation dans les conditions décrites dans les sections 5.5 et 5.12.1, une mortalité cellulaire dépendante de la concentration de A β 42 est observée dans les lignées cellulaires d'origine leucémique humaine K562 et K562/ADR ainsi que dans la lignée neuronale SH-SY5Y (voir Tableau V). Ces résultats montrent que les préparations possèdent une activité biologique.

Aucune différence entre la mortalité induite par A β 42 dans les lignées K562 et K562/ADR n'est mise en évidence. Il en est de même en ce qui concerne la lignée neuronale SH-SY5Y, suggérant que l'augmentation de la toxicité provoquée par des concentrations croissantes de A β 42 est indépendante du modèle cellulaire. Le pourcentage de mortalité cellulaire observé en absence du peptide amyloïde (20-22%) a été attribué aux conditions de culture des lignées cellulaires spécifiques pour tous les essais de toxicité, notamment l'élimination du sérum du milieu de culture, composant censé interagir avec le peptide

amyloïde et qui diminuerait sa concentration effective en solution, (Biere *et al*, 1996). Des résultats semblables à ceux obtenus en absence du peptide, ont été observés lorsque les différentes lignées cellulaires ont été incubées en présence du solvant utilisé pour la préparation de A β 42. Par ailleurs, puisque des pourcentages de mortalité cellulaire proches au 100% ont été observés à la concentration la plus élevée de A β 42 testée (4 μ M), il n'a pas été jugé nécessaire d'évaluer des concentrations de A β 42 supérieures à 4 μ M.

Il est important aussi de signaler que l'absence de différences significatives entre la mortalité cellulaire induite par A β 42 dans les lignées cellulaires K562 et K562/ADR peut être considérée comme un indice négatif en ce qui concerne la participation de la P-gp à l'efflux de A β car il était logique de s'attendre à des effets toxiques moindres dans la lignée où ce transporteur est surexprimé (cellules K562/ADR).

Tableau V. Mortalité cellulaire induite par le peptide A β 42 dans différentes lignées cellulaires après trois jours d'incubation. Les résultats sont exprimés sous la forme : pourcentage de mortalité cellulaire \pm Déviation Standard avec $n \geq 4$ dans tous les cas

POURCENTAGE DE MORTALITE CELLULAIRE			
Concentration d'A β 42 (μ M)	Lignée cellulaire K562	Lignée cellulaire K562/ADR	Lignée cellulaire SH-SY5Y
0	21,8% \pm 2,6	23,8% \pm 0,8	16,7% \pm 3,9
1	40,0% \pm 0,5	38,4% \pm 5,8	24,1% \pm 1,8
2	63,8% \pm 7,9	78,8% \pm 1,9	40,8% \pm 6,5
4	97,9% \pm 0,6	96,7% \pm 2,4	82,5% \pm 7,3

6.4.2.- Evaluation des effets toxiques du peptide A β 42 dans la lignée cellulaire SH-SY5Y : modifications de la concentration intracellulaire de chlorure

Les mesures de la concentration intracellulaire de Chlorure dans les cellules neuronales, lors de leur traitement avec A β 42, nous a permis d'évaluer si ce paramètre était

affecté comme résultat des effets déclenchés par ce peptide, nous aidant à construire une « cartographie » des processus cellulaires modifiés avant que la mort neuronale ait lieu.

Parmi les effets entraînant la mort cellulaire liée à la présence du peptide amyloïde, le dérèglement des gradients de concentrations de certains ions entre le cytoplasme et l'extérieur cellulaire a été proposé (Simakova and Arispe, 2006 ; Sepulveda *et al*, 2010 ; Shirwany *et al*, 2007 ; Aguayo *et al*, 2009). La plupart des travaux existants portent sur la variation des concentrations de Ca^{2+} induites par $\text{A}\beta$. Compte tenu de l'importance générale de la préservation des gradients des ions afin d'assurer l'efficacité synaptique ainsi que pour la régulation du volume cellulaire (Blaesse *et al*, 2009 ; Chamma *et al* 2012), notre intérêt s'est porté sur la question de savoir si $\text{A}\beta_{42}$ était également capable de générer une altération de la concentration intracellulaire des ions Cl^- . Il a été proposé que sous certaines conditions, les canaux formés par le peptide $\text{A}\beta$ peuvent admettre le passage d'anions tels que les chlorure (Micelli *et al*, 2004).

La concentration intracellulaire de Cl^- [Cl^-_i] a été déterminée à l'aide de la sonde fluorescente MQAE (figure 35) d'après la méthode développée par Verkman et collaborateurs (1989).

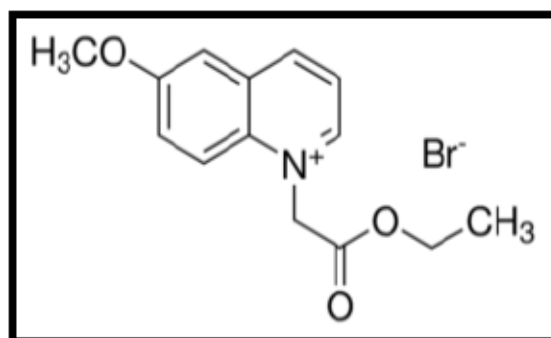


Figure 35. Structure de la sonde fluorescente MQAE

Le MQAE fluoresce à 470 nm quand il est excitée à 365 nm. L'intensité de la fluorescence de cette sonde varie en fonction de la concentration de chlorure. En bref, on observe une extinction du signal fluorescent de la sonde due aux collisions avec les ions halogénure. Par conséquent, l'intensité de la fluorescence mesurée est inversement proportionnelle à la concentration en ions chlorure. Afin de mesurer la concentration intracellulaire de chlorure dans les cellules neuronales traitées ou non avec A β 42 pendant 72 heures, les cellules SH-SY5Y (incubées avec cette sonde ont été lavées et résuspendues dans des tampons HEPES contenant différentes concentrations de Chlorure (3 – 97 mM, voir tableau III, page 87). Deux enregistrements types obtenus lors de ces expérimentations sont montrés dans la figure 36. Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'intensité de la fluorescence des cellules incubées avec la sonde (F_i) dépend de la concentration des ions chlorure intracellulaires. On peut dire alors que la concentration de chlorure dans l'expérience 1 est inférieure à celle de l'expérience 2. Les cellules sont ensuite traitées avec 4% de Triton X-100, entraînant une perméabilisation des membranes et une égalisation des concentrations intra et extracellulaire d'ions chlorure. Après l'ajout du Triton, l'intensité de fluorescence est F_x (Figure 36). Le calcul du rapport $(F_x - F_i) / F_i$, permet de construire un graphique type montré dans la Figure 37. Ce graphique permet d'estimer la concentration intracellulaire de chlorure. Les résultats de ces estimations sont présentés dans le tableau VI. Lors de ces essais, les cellules ont été incubées avec le peptide A β à 0,5 μ M, de façon à ce que la mortalité cellulaire ne soit pas différente de celle obtenue dans les cellules non traités avec le peptide à la fin d'un temps d'incubation de 72 heures. En présence de A β 42 on mesure une concentration intracellulaire $[Cl^-]_i = 105 \pm 9$ mM. Cette concentration est plus forte que celle mesurée dans les contrôles (entre 80 et 84 mM). La présence de 0,5 μ M de A β 42 induit donc une augmentation de la concentration intracellulaire d'ions chlorure.

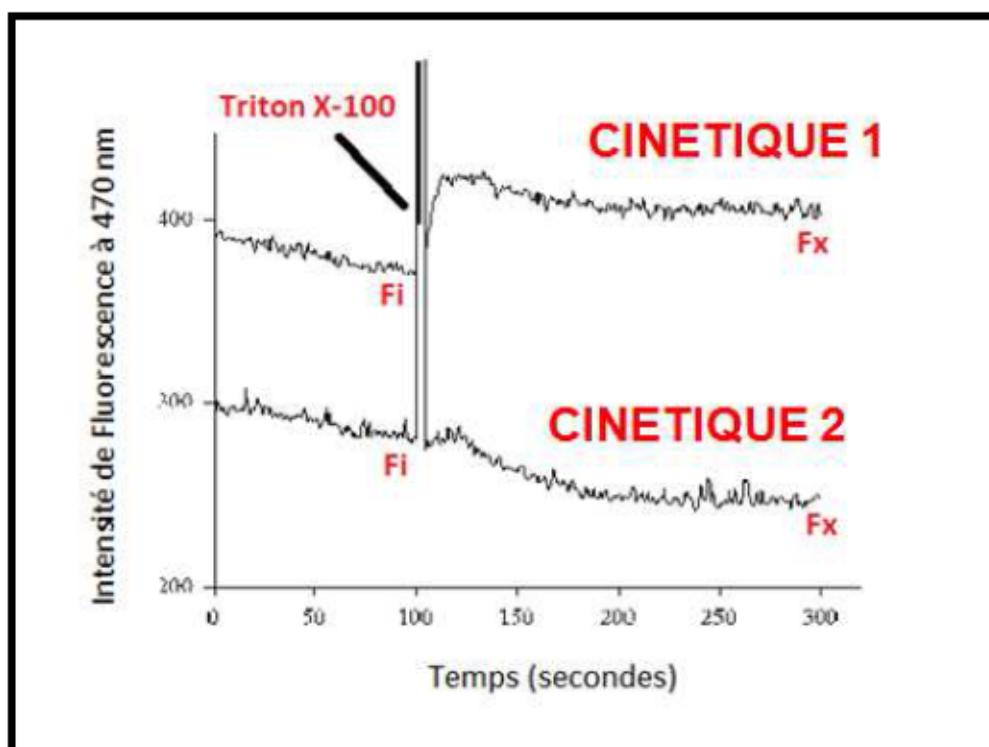


Figure 36. Exemple de cinétique de fluorescence obtenue lors des mesures de la concentration intracellulaire d'ions chlorure dans les cellules SH-SY5Y. Les cellules incubées avec le MQAE sont placées dans des tampons contenant des concentrations variables de chlorure entre 3 et 97 mM. Le signal fluorescent entre 0 et 100 secondes des cellules en suspension est F_i . Après le traitement avec du Triton X-100 l'intensité de fluorescence change de F_i à F_x (cinétiques entre 100 et 300 secondes). D'après les explications données précédemment, on peut dire que la concentration de chlorure est inférieure dans la suspension cellulaire donnant lieu au signal 1 par rapport à celle donnant lieu au signal 2.

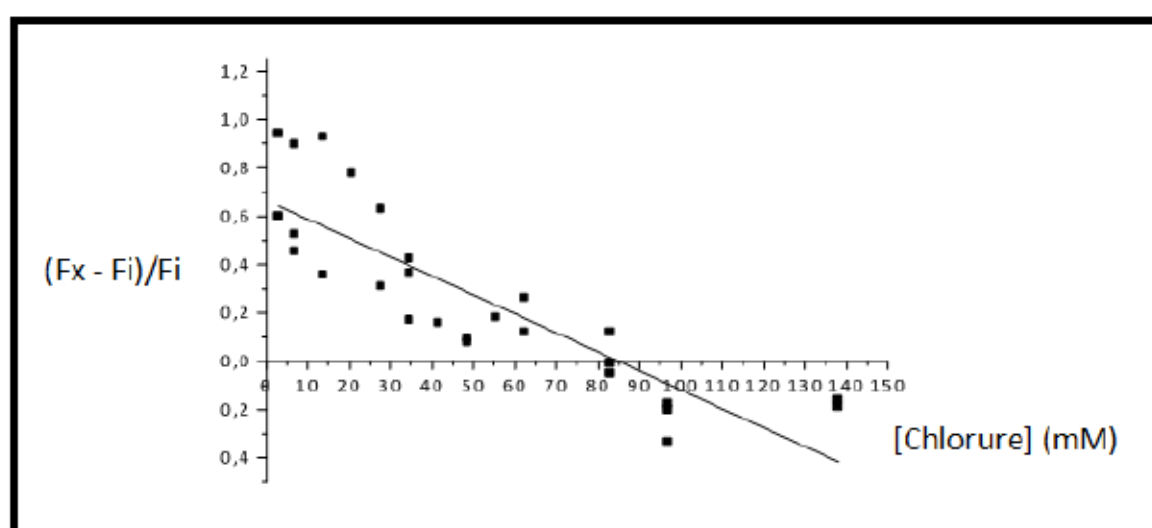


Figure 37. Graphique type permettant le calcul de la concentration intracellulaire d'ions chlorure par la méthodologie du point nul où la valeur $(F_x - F_i)/F_i$ est égale à zéro

Tableau VI. Variation de la concentration intracellulaire d'ions chlorure (Cl⁻) dans la lignée cellulaire SH-SY5Y en présence du peptide A β 42 pendant 72 heures

Condition	Concentration de chlorure intracellulaire mesurée (mM)
Cellules cultivées dans un milieu contenant du sérum	84 \pm 6
Cellules cultivées dans un milieu sans sérum	80 \pm 6
Cellules cultivées dans un milieu sans sérum en présence du solvant	80 \pm 8
Cellules cultivées dans un milieu sans sérum en présence de 0,5 μ M d'A β 42	105 \pm 9

6.4.3.- Evaluation des effets toxiques du peptide A β 42 dans la lignée cellulaire SH-SY5Y : modifications du potentiel membranaire mitochondriale.

Le dysfonctionnement probable des organites tels que la mitochondrie dans la maladie d'Alzheimer a aussi été proposé (Andrews *et al*, 2005 ; Duchen, 2005). Etant donné l'importance de la mitochondrie dans la production de l'ATP nécessaire pour garantir la survie des cellules, nous nous sommes intéressés à savoir si la présence de A β 42 était capable de produire une modification du *potentiel de membrane mitochondriale*, ($\Delta\Psi_{mit}$) dans les cellules neuronales (lignée SH-SY5Y).

Pour ce faire nous avons utilisé la TMR. Les cellules ont été cultivées dans des conditions similaires à celles employées pour l'essai de l'effet du peptide sur la concentration intracellulaire de chlorure. Après trois jours d'incubation des **cellules neuronales dans un milieu de culture sans sérum**, la fluorescence d'une population de cellules incubées dans un tampon HEPES/Na⁺ avec 0,5 μ M TMR a été mesurée. On observe d'abord une augmentation de la fluorescence correspondant à la fluorescence de la TMR dans le milieu extracellulaire puis une diminution correspondant à l'entrée de la TMR dans la cellule et à son accumulation dans les mitochondries sous l'effet du potentiel membranaire (Perry *et al*, 2011). Les

potentiels membranaires dans ces conditions sont $\Delta\Psi_{\text{mit}} \neq 0$ et $\Delta\Psi_{\text{mp}} \neq 0$ pour la mitochondrie et la membrane plasmique respectivement. Finalement, l'ajout du Triton X-100 perméabilise les membranes. Dans ces conditions, la TMR ne reste plus séquestrée dans les mitochondries et sa fluorescence redevient égale à sa valeur initiale (Figure 38a).

Une expérience similaire effectuée en présence de 1 μM de FCCP n'entraîne pas de diminution du signal fluorescent de la TMR (Figure 38b). Ceci est dû à l'élimination des potentiels membranaires induite par le FCCP ($\Delta\Psi_{\text{mit}} = 0$) et par conséquent à l'absence d'accumulation de la TMR dans les mitochondries.

Le même schéma d'incorporation de la TMR est obtenu pour les cellules cultivées en présence du peptide A β 42 (Figure 38c), c'est-à-dire, une faible accumulation de la TMR dans les mitochondries. Ceci est dû à une diminution du potentiel mitochondriale qui ne peut être provoquée que par la présence de A β 42.

L'analyse de l'ensemble des données présentées ci-dessus permettent de suggérer que la présence de A β 42 induit non seulement une modification de la concentration intracellulaire de chlorure, mais modifie aussi d'autres paramètres physiologiques pouvant être à l'origine de la mort cellulaire.

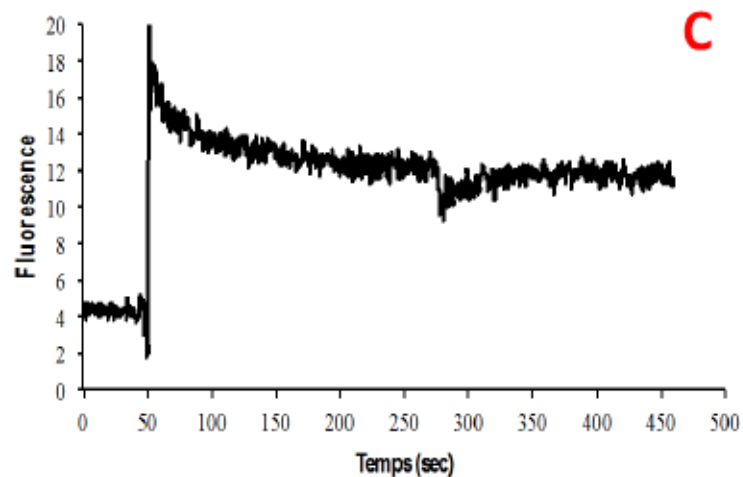
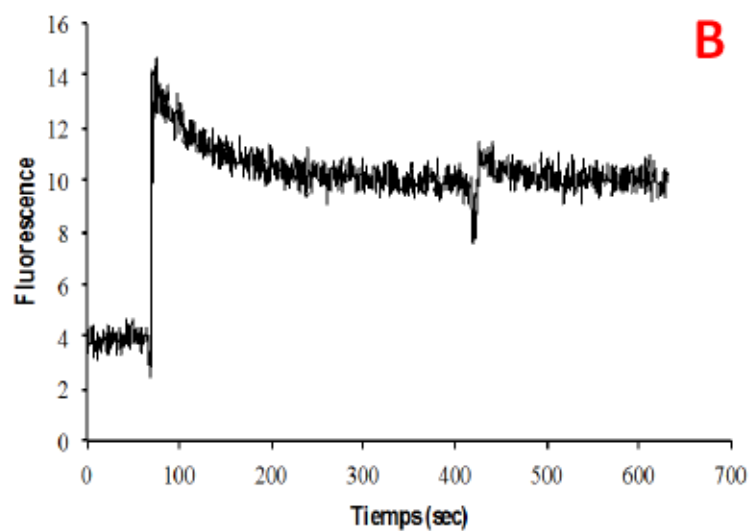
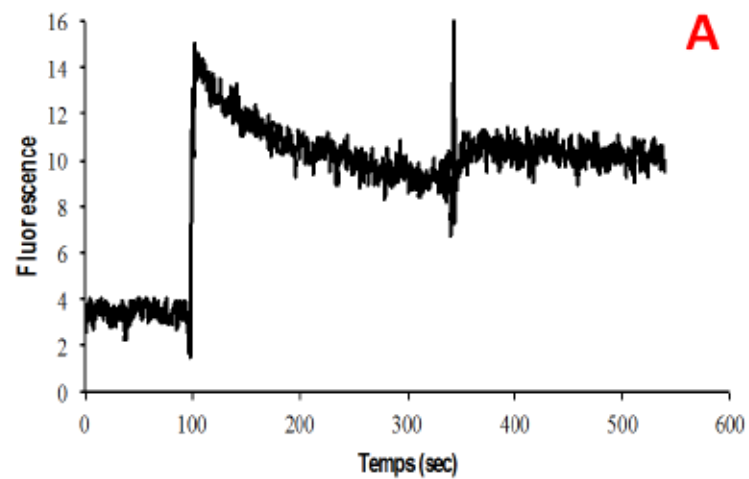


Figure 38. Cinétiques montrant la variation du signal fluorescent de la TMR dans des cellules SH-SY5Y traitées ou non avec le peptide A β 42

6.5.- Discussion

6.5.1.- Transport du peptide A β 42 par la P-gp

Parmi les idées acceptées sur la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, figure celle de la présence de deux marqueurs histopathologiques, à savoir : les dégénérescences neurofibrillaires et les plaques amyloïdes. Ces dernières sont le produit de l'accumulation des agrégats du peptide amyloïde A β formant des dépôts extracellulaires insolubles. Le peptide amyloïde, étant généré dans des conditions physiologiques, plusieurs hypothèses sur sa fonction au niveau cellulaire ont été proposées. Cependant, il n'y a encore aucune certitude dans ce domaine. A ceci s'ajoute la méconnaissance des mécanisme(s) possible(s) auxquels ce peptide est assujéti pour assurer sa dégradation/élimination dans des conditions normales. Dans ce contexte il a été postulé qu'un déséquilibre entre la dégradation/élimination du peptide au niveau cérébral pourrait être l'événement à l'origine de cette maladie.

A ce titre, certains transporteurs présents au niveau de la BHE ont été proposés d'assurer l'efflux du peptide amyloïde du cerveau vers le sang. Un des candidats, la P-gp, constitue l'intérêt de cette thèse, en raison des contradictions existantes sur sa participation ou non à l'efflux du peptide amyloïde.

La P-gp étant un transporteur ABC, elle a besoin d'énergie sous forme d'ATP afin de pouvoir transporter ses substrats spécifiques depuis le cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Pendant ce processus de transport, l'ATP est hydrolysée en ADP et Pi (phosphate inorganique). Cependant, même en absence de molécules pouvant servir de substrat à la P-gp, une hydrolyse de l'ATP peut être mesurée. Elle est connue sous le nom d'activité ATPase basale. C'est donc en présence d'un substrat, qu'une modulation de cette activité, notamment une stimulation, a lieu. Or, l'un des critères les plus souvent utilisés, dans

le but de tester si une molécule est ou non substrat de cette protéine, est la mesure de cette activité, ce qui a contribué à établir une liste des molécules transportées par la P-gp, dont une partie est présentée dans le tableau VII.

Tableau VII : Sélection de substrats identifiés pour la P-gp

Activité / Fonction	Nom	Poids moléculaire (Daltons)
Analgsiques	Asimadoline	414
	Morphine	285
Anti arythmiques	Amiodarone	645
	Propafénone	341
	Quinidine	324
Antibiotiques	Érythromycine	734
	Gramicidine D	1882
	Valinomycine	1111
Drogues anti cancéreuses	Vinblastine	811
	Vincristine	895
	Paclitaxel	854
	Docétaxel	808
	Doxorubicine	543
	Daunorubicine	564
	Epirubicine	543
	Methotrexate	454
	Topotécan	454
Inhibiteurs de canaux calciques	Azidopine	577
	Diltiazem	414
	Nifédipine	346
	Vérapamil	381
Colorants	Rhodamine 123	381
	Hoechst 33342	616
Peptides	ALLN	383
	Leupeptine	426
	Pepstatine A	686
Produits naturels	Colchicine	399
	Curcumin	368

Dans cet esprit, la première approche utilisée dans le développement de ce sujet de thèse a été la mesure de l'activité ATPase en présence de différentes concentrations du peptide A β 42. Ces mesures ont été effectuées dans des vésicules de membrane de cellules sur exprimant la P-gp (lignée cellulaire K562/ADR). Les résultats obtenus lors de ces mesures montrent une apparente stimulation de l'activité ATPasique basale aux concentrations de A β 42 essayées, mais le même effet est obtenu lors de l'incubation des vésicules de membrane avec le solvant utilisé pour la dissolution du peptide. La comparaison des deux résultats permet de dire que, dans nos conditions expérimentales, **le peptide A β 42 n'a aucun effet sur l'activité ATPasique basale de la P-gp.** Cependant, ces observations contredisent celles publiées par Lam et collaborateurs (2001), qui ont rapporté une stimulation de l'activité ATPasique en présence de A β 42 et en ont conclu que ce peptide était un substrat de la P-gp (Lam *et al*, 2001). Cependant, en absence de détails sur la méthode utilisée par ces auteurs pour le mode de solubilisation du peptide, l'interprétation de leurs résultats reste sujette à caution. En tout cas, une question a été posée lors de cette étape d'expérimentations : la stimulation de l'activité ATPase est-elle la preuve d'un éventuel transport de A β 42 ?

Du point de vue moléculaire, le peptide amyloïde est fortement hydrophobe, d'où sa tendance à former les agrégats observés dans les coupes du cerveau post-mortem de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Un des modèles proposés pour le fonctionnement de la P-gp comme pompe d'efflux consiste à lui attribuer un comportement de « flippase » (Higgins and Gottesman, 1992). Une brève description du modèle est proposée dans le chapitre 4 (section 4.4.1). Si on prend en compte ce modèle, dans le cas où ce peptide serait un substrat de la P-gp, son transport impliquerait un passage à travers la membrane pour se situer au niveau du cytoplasme. A cet égard, dans un milieu aqueux tel que le cytoplasme, le peptide aurait tendance à s'agréger, rendant sa sortie de la cellule un événement difficile tant par la taille des agrégats que par la taille du site actif de la P-gp.

A partir de la fin des années 1980, certains peptides ont été identifiés comme pouvant traverser la membrane plasmique. Ils sont appelés communément *Cell-Penetrating Peptides* (CPP). L'étude de ces différents peptides a contribué à produire un tableau général indiquant les propriétés des peptides censés être des CPPs. Les différences entre les caractéristiques des CPPs et celles du peptide A β 42 seront discutées tout au long des prochains paragraphes afin d'appuyer les considérations moléculaires déjà énoncées concernant l'entrée du peptide A β 42 dans le cytosol, événement nécessaire pour un transport par la P-gp d'après le modèle de la « flippase » (Higgins and Gottesman, 1992).

D'une façon générale, les CPPs peuvent être repartis en trois classes : i) peptides dérivés des protéines, ii) peptides chimériques résultants de la fusion de deux séquences, et, iii) peptides synthétisés d'après des études structure-activité (Bechara and Sagan, 2013). Une classification plus fine, suivant les propriétés physico-chimiques des CPPs a été aussi proposée (Milletti, 2012). Considérant les trois classes proposées par Bechara et Sagan (2013), dans le cas où le peptide A β 42 serait un CPP, il appartiendrait à la première classe dans la mesure où il est dérivé de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP).

Les CPPs sont définis comme des peptides ayant une longueur comprise entre 5 et 30 acides aminés et pouvant traverser les membranes plasmiques par des mécanismes dépendants ou indépendants d'énergie produisant une toxicité cellulaire faible (Lundberg and Langel, 2003 ; Bechara and Sagan, 2013 ; Lindgren *et al*, 2000 ; Milletti, 2012 ; Mussbach *et al*, 2011). Par contre, le peptide A β 42 possède une séquence de 42 acides aminés et les effets toxiques sur les cellules suite à son interaction avec des membranes cellulaires ont été largement étudiés (Simakova and Arispe, 2007).

Les CPPs identifiés à ce jour présentent une séquence contenant majoritairement des acides aminés basiques, donnant aux peptides une charge nette positive. Il y a cependant des

exceptions, ainsi, des peptides amphipatiques et hydrophobes ont également été identifiés, qui sont chargés positivement à environ 83%. Il a été montré que cette charge nette positive est principalement due à la présence de plusieurs résidus d'Arginine (Arg) dans la séquence des CPPs. Grâce à la chaîne latérale composée par un groupe guanidine, la formation des liaisons hydrogène avec les groupes phosphate, sulfate et carboxylate présents dans les membranes cellulaires et chargés d'emblée négativement permet la création des conditions moléculaires pour l'internalisation des CPPs. Le nombre d'arginines nécessaire pour une internalisation optimale a été estimé entre 7 et 15 (Bechara and Sagan, 2013 ; Lundberg and Langel, 2003 ; Futaki *et al*, 2001 ; Herce et al, 2009 ; Schmidt et al, 2010 ; Milletti, 2012).

L'identification des CPPs hydrophobes est un élément à analyser soigneusement puisque, bien que les peptides hydrophobes arrivent à s'insérer dans les membranes, la plupart doivent probablement rester attachés à ces membranes, réduisant l'efficacité de l'internalisation. Cela a été mis en évidence par Walrant et collaborateurs (2012) après une étude de l'internalisation de deux peptides de la même taille riches en arginine mais aussi en acides aminés hydrophobes. Ces deux peptides, $(\text{Arg})_2(\text{Trp})_2(\text{Arg})_2\text{Trp}(\text{Arg})_2\text{-NH}_2$ et $(\text{Arg})_2(\text{Leu})_2(\text{Arg})_2\text{Leu}(\text{Arg})_2\text{-NH}_2$ ont montré des différences d'internalisation. Le premier arrive à s'insérer et à traverser les membranes tandis que le deuxième s'insère mais ne traverse pas les membranes. Ces différences ont été attribuées à la substitution dans la séquence du deuxième peptide des Tryptophanes par des Leucines, rendant celui-ci plus hydrophobe (Walrant *et al*, 2012).

En raison de sa séquence d'acides aminés, le peptide amyloïde a un caractère hydrophobe et est chargé négativement à pH physiologique; une explication détaillée sur la charge de A β 42 sera donnée par la suite. Ces deux caractéristiques ne coïncident pas avec celles qui viennent d'être mentionnées pour les CPPs. De plus il n'y a qu'un résidu arginine (Arg₅) parmi les quarante-deux acides aminés qui composent A β 42.

A ce jour, aucune étude sur la possibilité de considérer le peptide A β 42 comme un CPP n'a été faite. Néanmoins, d'après la comparaison des caractéristiques des peptides qui ont été classés CPPs et celles de A β 42, il est possible de prévoir que ce dernier ne sera pas un peptide appartenant à cette classe.

Le mécanisme de transport de A β proposé en 2010 par Hartz et collaborateurs, met en jeu non seulement la P-gp mais également celle d'un récepteur également présent dans la BHE : LRP-1. D'après ce mécanisme, LRP-1 participe à l'étape initiale de l'efflux de A β , du parenchyme cérébral vers l'endothélium, laissant ensuite ce peptide soumis à la P-gp, qui va le transporter vers le sang (Hartz *et al*, 2010). Il est accepté que les récepteurs de type LRP forment des complexes avec leurs ligands, qui peuvent par la suite entrer dans la cellule par endocytose via des vésicules couvertes de clathrine. Ces complexes sont ensuite libérés dans les endosomes, endroit où les conditions d'acidité (faible pH) déclenchent la séparation des ligands du récepteur pour la dégradation des premiers et le retour à la membrane du second (Anderson *et al*, 1978 ; Jeon and Blacklow, 2005). De cette façon, LRP-1 promeut la dégradation de ses ligands physiologiques, les LDL. Si le mécanisme proposé par Hartz et collaborateurs en 2010 est pris tel qu'il est, une fonction de promotion de la transcytose du ligand devrait être attribuée au récepteur LRP-1. Sur cet aspect, une étude publiée par Nazer et collaborateurs (2008) sur la participation du LRP-1 ainsi que de la P-gp dans l'efflux du peptide A β 40, dans un modèle *in vitro* de la BHE, montre une dégradation intracellulaire du peptide par LRP-1 (Nazer *et al*, 2008). Si ce résultat est transposé au modèle de Hartz et collaborateurs, il se trouve que la première étape du transport n'est pas censée se produire puisque une dégradation intracellulaire du peptide, suite à son endocytose avec le LRP-1, est non seulement en accord avec la fonction attribuée au récepteur (promotion de l'endocytose) mais montre aussi qu'un processus de transcytose n'a pas lieu. En absence de ce processus, il n'y aurait pas de peptide A β dans l'endothélium susceptible d'être pris en charge par la P-gp.

Concernant la P-gp, Nazer et collaborateurs ont observé une absence de transport du peptide A β 40 dans des cellules surexprimant la P-gp. Ce dernier résultat appuie nos observations de la toxicité du peptide A β 42 sur des lignées surexprimant ou non la P-gp, la non stimulation de l'activité ATPase dans des vésicules de membrane en présence de ce peptide et la non modification de la vitesse d'efflux de la Pira en présence de ce peptide.

En ce qui concerne la toxicité du peptide A β 42 il est pleinement accepté que celle-ci est liée à son insertion dans les membranes et la formation de « pores » qui dérèglent les concentrations ioniques au niveau cellulaire (Arispe et al, 1993, 1994 et 2007 ; Kawahara and Kuroda, 2000 ; Lin *et al*, 2001 ; Sepulveda *et al*, 2010). On peut spéculer que lors de cette insertion il y existerait un « contact » avec la P-gp ou une déstabilisation des membranes conduisant à une stimulation de l'activité ATPase sans pour autant qu'il y ait transport. Cette remarque est justifiée par la dissertation d'Ohtsuki et collaborateurs (2010) sur l'hypothèse d'un transport du peptide amyloïde par la P-gp. Les auteurs proposent trois alternatives : i) le peptide est transporté par la P-gp, ii) le peptide interagit avec la P-gp sans être transporté par celle-ci et iii) la P-gp n'interagit et/ou ne transporte que des produits de dégradation de A β . (Ohtsuki *et al*, 2010).

Les observations présentées par Poojari et collaborateurs (2013) concernant l'insertion des formes de petite taille ainsi que des oligomères du polypeptide amyloïde de l'îlot de Langerhans (hIAPP, de l'anglais *Human Islet Amyloid Polypeptide*) dans des monocouches et des bicouches lipidiques (Figure 39), et la déstabilisation de l'intégrité membranaire entraînée par cette insertion (Poojari *et al*, 2013) vont dans le même sens de la proposition concernant la formation de canaux par le peptide amyloïde et aussi de l'hypothèse d'une déstabilisation membranaire présentée dans le paragraphe précédent.

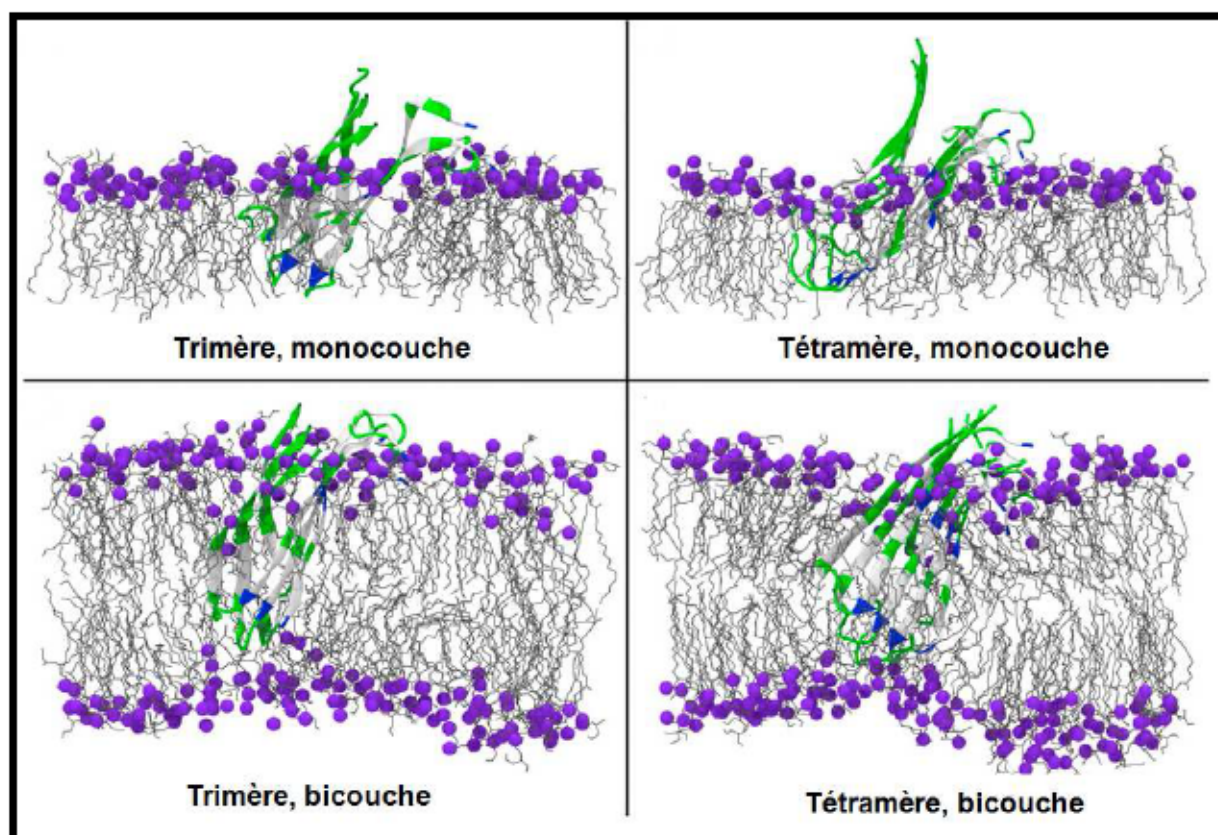


Figure 39. Structures stables du polypeptide amyloïde de l'îlot humain (hIAPP) dans des monocouches et des bicouches composées de dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) suite à des simulations de dynamique moléculaire D'après Poojari et al, 2013

Ces considérations s'appuyant d'une part sur la bibliographie, et d'autre part sur le fait de ne pas avoir observé une modification de l'activité ATPase de la P-gp en présence du peptide A β 42, nous amènent à douter de l'idée d'efflux de A β par la P-gp. En raison de ces observations, d'autres expériences ont été faites par la suite.

Comme tous les autres systèmes hétérotrophes, les cellules nécessitent des substrats organiques carbonés pour sa croissance et son développement, utilisant des acides aminés, des acides gras et des hydrates de carbone afin d'obtenir de l'énergie. Dans des conditions physiologiques, la majeure partie de cette énergie est obtenue à partir du métabolisme du glucose par la voie d'*Embden-Meyerhoff* mais aussi via la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie, et est stocké sous forme d'ATP. Or, si ces voies sont inhibées *in vitro*

par l'élimination du glucose disponible dans le milieu cellulaire et par l'utilisation de NaN_3 respectivement, les cellules n'auront pas l'énergie nécessaire pour assurer son fonctionnement en termes des réactions cellulaires dépendantes de l'ATP. Si on rapproche ces conditions à l'activité d'efflux menée par la P-gp, ce traitement permet d'arrêter le transport des substrats. Afin d'approfondir notre étude et compte tenu de notre observation montrant que la stimulation de l'activité ATPase en présence du peptide $\text{A}\beta_{42}$ n'était pas différente de celle provoquée le solvant du peptide, des expériences sur des cellules vivantes surexprimant de manière stable la P-gp (lignée K562/ADR) ont été effectuées afin de mesurer la vitesse d'efflux d'un substrat connu de cette protéine, la Pirarubicine, en présence de $\text{A}\beta_{42}$. Il a été montré que les substrats *bona fides* de la P-gp peuvent entrer en compétition avec d'autres substrats lors des expériences menées dans des vésicules de membrane ainsi que dans des proteoliposomes (Doige and Sharom, 1992). Nous avons observé qu'aux concentrations de peptide utilisées, aucune modulation de la vitesse d'efflux de la Pira statistiquement significative n'a pas été observée lors de nos essais. Or, ces résultats ont attiré notre attention, non seulement parce qu'ils contredisent la stimulation de l'activité ATPase en présence de $\text{A}\beta_{42}$ observée par Lam et collaborateurs mais, en même temps, ils renforcent les considérations moléculaires déjà faites sur les possibilités d'un non transport de $\text{A}\beta_{42}$ par la P-gp.

Parmi les critères définis pour qu'une molécule puisse être substrat de la P-gp, figure celui de la taille. De fait, les substrats identifiés de ce transporteur ont un poids moléculaire qui varie entre 200 et 1900 Da (tableau VII). La taille de la Pira est de 627 Da. Par ailleurs, mis à part les quelques peptides synthétiques de petite taille qui ont été identifiés comme des substrats de la P-gp (Sarkadi *et al*, 1994 ; Sharom *et al*, 1995, 1996 et 1998 ; Oude Elferink and Zadina, 2001 ; Eytan *et al*, 1994), aucun peptide appartenant au milieu cellulaire n'a été caractérisé comme tel. Donc, l'absence de modifications de la vitesse d'efflux de la Pira ne

peut pas s'avérer comme surprenante. Il est en effet, difficile de penser qu'un peptide de 4 kDa de taille et 42 acides aminés dans sa forme monomérique (sans exclure les grands agrégats qui pourraient se former dans un milieu éminemment aqueux tel que le cytoplasme dans le cas d'une entrée du peptide à la cellule) puisse être transporté par la P-gp. Cet aspect portant sur la taille de la molécule susceptible d'être transportée, a été évoqué dans certains travaux de recherche. Sharom et collaborateurs (1996) ont fait une étude de l'effet des peptides synthétiques de la série *NAC-(Leu)_n-Tyr-amide* sur le transport de la colchicine par la P-gp. D'après leurs observations, l'interaction avec la P-gp est maximale lorsque la taille du peptide atteint trois acides aminés (peptide *NAC-(Leu)₂-Tyr-amide*) et une diminution est observée quand cette taille augmente (peptides *NAC-(Leu)₃-Tyr-amide* versus *NAC-(Leu)₅-Tyr-amide*). Ces observations concernant la taille des peptides sont confirmées par Russ et collaborateurs (*Russ et al, 1998*) dans leur évaluation de la contribution de la P-gp au transport de deux peptides antigéniques synthétiques de 9 acides aminés et typiquement hydrophobes (peptides *Leu-Tyr-Gln-(Asn)₂-Gly-Thr-Tyr-Val* et *Thr-Tyr-Asn-Arg-Thr-Ala-Arg-Leu-Val*). Ces auteurs n'ont observé aucun transport de ces peptides, malgré la surexpression de la P-gp (Russ et al, 1998).

Un travail publié par Loo et Clarke en 2001 porte sur la détermination des dimensions du domaine de fixation des substrats de la P-gp humaine (Loo and Clarke, 2001). Ce travail a été effectué dans la lignée HEK 293 exprimant la P-gp. L'idée était d'évaluer si de différentes cross-linkers de méthane thiol sulfonât avec des diamètres variables pouvaient interagir avec la P-gp. Les auteurs ont trouvé une stimulation de l'activité ATPase de la P-gp en présence de ces composés, suggérant que les molécules testées étaient elles-mêmes des substrats de la P-gp. Par ailleurs, les niveaux de stimulation de cette activité se sont avérés différents. Les différences observées dans cette stimulation de l'activité ATPase du transporteur ont été attribuées aux tailles des cross-linkers (Loo and Clarke, 2001).

Les auteurs aboutissent à la proposition d'un modèle dans lequel le domaine d'union aux substrats de la P-gp est représenté sous la forme d'un entonnoir, avec la partie la plus étroite vers le côté cytosol et la partie plus large vers le milieu extracellulaire. La distance des deux parties est de 9 – 25 Å pour la partie étroite et de 50 Å pour la plus large (Figure 40). La taille des substrats est telle que ceux-ci peuvent s'adapter à la taille de l'entonnoir. La région avec un diamètre de 9 – 25 Å a été désignée comme celle qui a plus d'affinité pour le substrat, tandis que la région de 50 Å de diamètre serait d'une faible affinité pour les substrats et pourtant associée à la libération de celui-ci vers le milieu extracellulaire (Ambudkar et al, 2006). Ces dimensions sont compatibles avec l'étude de Sauna et collaborateurs (2004), où des formes homodimères de stipiamide, un antibiotique ayant des activités contre le virus d'immunodéficience humaine et les infections par champignons, mais aussi comme reverseur de la résistance aux médicaments des cellules cancéreuses (Andrus and Lepore, 1997) ont été liées à des éthers de polyéthylène glycol donnant lieu à des molécules de longueurs comprises entre 3 Å et 50 Å (Sauna *et al*, 2004). Les auteurs ont reporté une stimulation de l'activité ATPase pour les molécules ayant une longueur de jusqu'à 22 Å (Sauna *et al*, 2004).

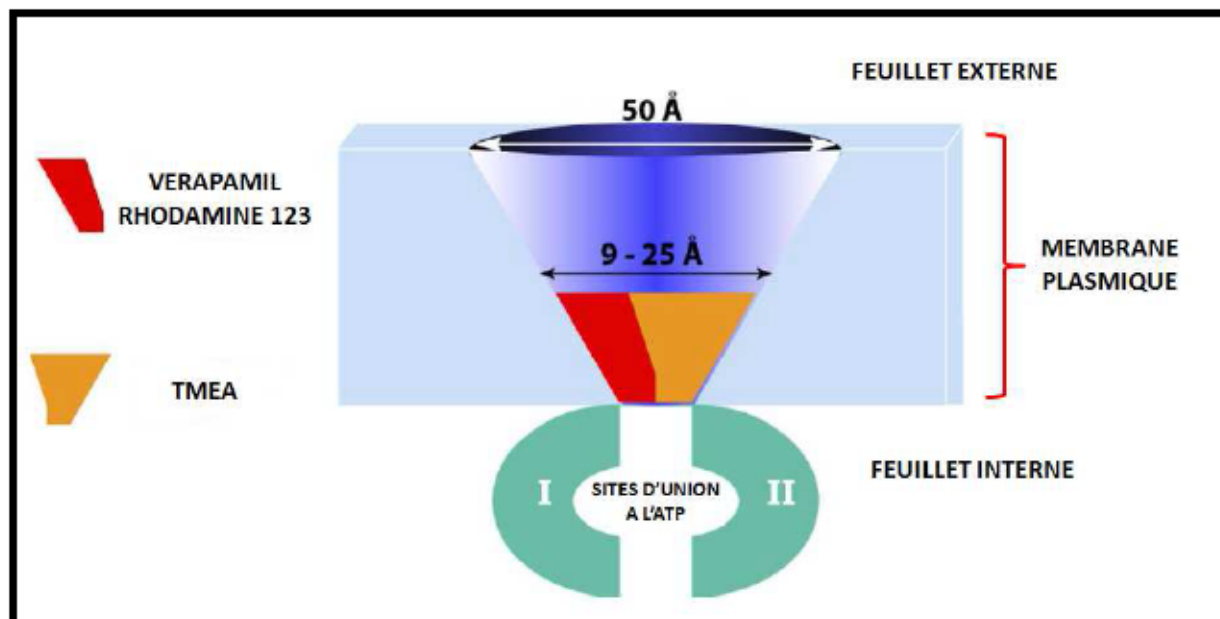


Figure 40. Représentation schématique de la poche d'union de substrats à la P-gp. Les dimensions mentionnées ont été obtenues à partir des données de Sauna et al, 2004 et Loo and Clarke, 2001. Trois exemples de molécules pouvant interagir avec ce site sont mentionnées : le vérapamil et la rhodamine 123 (en rouge) ont une faible affinité pour le site, tandis que le TMEA (Tris-(2-maleimidoethyl) amine) a une forte affinité.

Ces observations donnent des informations importantes sur les dimensions du site actif de la P-gp et peuvent être utilisés pour renforcer les arguments qui vont à l'encontre de la proposition du transport de A β par la P-gp. Si l'on considère que les agrégats formés par le peptide A β au sein des neurones peuvent atteindre une taille supérieure à 50 Å (Morgado and Fändrich, 2011), il est difficile de penser qu'une molécule de cette taille puisse s'accommoder dans un site dont les dimensions viennent d'être décrites. Il en est de même pour les autres intermédiaires de la voie d'agrégation du peptide amyloïde. Pour des formes non agrégées, la structure secondaire prédominante est celle de type hélice alpha. Dans cette conformation, les acides aminés sont distribués de façon qu'il y ait environ 3,6 résidus par tour d'hélice. Pour une forme monomère de A β 42, avec 42 acides aminés, il se trouve qu'il formerait une hélice alpha de 11,7 tour (42 acides aminés divisés par 3,6 acides aminés/tour). Il est connu que chaque tour d'une hélice alpha est séparée de l'autre par une distance de 5,4 Å. Dans le cas

d'une hélice alpha de A β 42 de 11,7 tours, la longueur de cette hélice serait d'environ 63 Å. Concernant les protofibrilles et les fibrilles, les diamètres associés à ces formes sont de 50 et 100 Å respectivement (Roychaudhuri *et al*, 2009). Il apparaît que dans tous les cas l'ajustement de A β au site actif de la P-gp paraît hautement improbable.

Il a également été proposé qu'une molécule pouvant être un substrat de la P-gp devait être électriquement neutre ou à défaut chargé positivement. Sur ce point, il est intéressant de signaler que dans la séquence de A β 42 il y a des acides aminés comportant des chaînes latérales ionisées ou non en fonction du pH. Ainsi, 6 résidus sont chargés négativement à pH physiologique: Asp₁, Glu₃, Asp₇, Glu₁₁, Glu₂₂ et Asp₂₃. Par ailleurs, 3 résidus sont chargés positivement au même pH : Arg₅, Lys₁₆ et Lys₂₈ (Les indices indiquent la position des acides aminés dans la séquence de A β 42). Etant donné que le pKa de la chaîne latérale de l'Histidine est de 6, les résidus de cet acide aminé situés dans les positions 6, 13 et 14 sont neutres à pH physiologique. Tout cela, donne une charge nette négative de -3 au peptide A β 42 à pH 7,4. Cette observation constitue une raison supplémentaire pour mettre en doute l'éventuel transport de A β 42 par la P-gp.

D'après les résultats de nombreux travaux de recherche, la mort neuronale observée lors de la maladie d'Alzheimer semble être le résultat direct des effets toxiques déclenchés par le peptide A β (Dahlgren *et al*, 2002 ; Deshpande *et al*, 2006 ; Hung *et al*, 2008). Ces résultats peuvent être compliqués à interpréter, notamment en raison des différentes préparations du peptide utilisées, la forme utilisée de celle-ci (A β 1-40 vs A β 1-42 vs A β 25-35 et ses séquences inverses), la conformation moléculaire (monomérique, dimérique, oligomérique, etc) liée directement au protocole de solubilisation employé lors des expérimentations, les concentrations testées (qui vont de l'ordre de nM jusqu'à μ M), les lignées cellulaires utilisées pour évaluer la toxicité et le temps d'incubation de ces cellules avec le peptide amyloïde.

D'où l'importance d'établir les conditions optimales de travail afin de ne pas arriver à des interprétations erronées des résultats.

Les essais de toxicité du peptide A β 42 sur les lignées cellulaires K562 et K562/ADR utilisés pendant cette thèse ont apporté non seulement des informations sur la « fonctionnalité des préparations » du peptide mais ont permis aussi d'avoir une autre approche sur la question centrale du travail : le peptide A β est-il pris en charge par la P-gp ? L'absence de différences significatives de toxicité entre les deux lignées cellulaires nous amènent aussi à douter du rôle possible de la P-gp dans l'efflux de A β , puisque la surexpression (lignée cellulaire K562/ADR) ou non de cette protéine (lignée cellulaire K562) semble ne pas être important pour la « protection » des cellules vis-à-vis de la mort entraînée par A β 42, contrairement à ce qu'on devrait attendre : une diminution de la toxicité dans la lignée K562/ADR, qui se traduirait par un pourcentage majeur de survie cellulaire ou un faible pourcentage de mort cellulaire, par rapport à la lignée K562.

Bien que ce seul critère soit insuffisant pour extraire des conclusions définitives, l'information que celui-ci apporte n'est pas négligeable et il est important de signaler que, parmi les travaux consultés sur le transport du peptide A β par la P-gp, l'utilisation de cette approche expérimentale ne figure pas. Or, cela constitue un des apports importants de cette thèse.

Nos résultats de toxicité du peptide A β 42 sur les lignées cellulaires K562 et K562/ADR mettent en doute les travaux où l'expression de la P-gp et d'autres transporteurs ABC a été corrélée avec la présence des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. A ce titre, Vogelgesang et collaborateurs (2002) ont trouvé une corrélation inverse entre les niveaux d'expression de la P-gp et la présence des plaques séniles dans le lobe temporal des

sujets âgés entre 50 et 91 ans, suggérant que ce fait peut influencer l'élimination du peptide A β (Vogelgesang *et al*, 2002).

Dans cette même lignée, Jeynes et Provias (2011) reportent une corrélation négative entre la présence des plaques séniles, les dégénérescences neurofibrillaires et l'expression de la P-gp dans des capillaires cérébraux de 10 patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Jeynes and Provias (2011), proposant aussi un lien entre les lésions et l'expression du transporteur.

Une autre étude publiée par Brenn et collaborateurs (2011) montre une diminution de l'expression de l'ARN messenger (ARNm) de la P-gp dans des souris traitées avec le peptide A β 42 (Brenn *et al*, 2011). Cette diminution a aussi été étendue aux récepteurs LRP-1 et RAGE (Brenn *et al*, 2011). Les auteurs proposent que le peptide A β régule l'expression des transporteurs.

Malgré tout, il n'est pas possible d'établir une corrélation entre les niveaux d'expression de l'ARNm et de la P-gp et le transport du peptide amyloïde. De façon générale, en raison des processus biologiques affectant l'ARNm tels que l'épissage, ainsi que la régulation et les modifications liées à la traduction peuvent affecter la quantité d'ARN et des protéines à différents niveaux (Guo *et al*, 2008).

6.5.2.- Toxicité du peptide A β 42

Les avances, depuis ces dernières années, dans la recherche sur l'étiologie de la maladie d'Alzheimer, ont permis d'identifier des acteurs moléculaires et des événements nécessaires pour le développement de cette maladie. Ainsi, il s'est avéré que les plaques amyloïdes observées dans les coupes cérébrales issues de patients atteints par la maladie

n'étaient pas les responsables de la mort neuronale. L'intérêt s'est alors centré sur les voies d'agrégation du peptide A β et sur la contribution des intermédiaires aux événements pathologiques. Parmi ces intermédiaires, pendant des années, les formes monomères de A β ont été considérées comme les plus toxiques. Cependant, de nos jours, il est accepté que ce soient les formes oligomères et non les formes monomères qui jouent un rôle prépondérant au niveau des effets toxiques de A β .

La liaison entre les manifestations cliniques de la maladie d'Alzheimer, parmi lesquelles la perte de mémoire, et l'identification des acteurs moléculaires ont abouti à la proposition selon laquelle les oligomères de A β exerceraient leur toxicité via une union aux synapses neuronales, modifiant par voie de conséquence leur forme, taille et composition (Lacor *et al*, 2007 ; Gong *et al*, 2004 ; Lacor *et al*, 2004). Ainsi, la perte des synapses est le fait le mieux corrélé à la diminution des habilités cognitives chez les patients atteint par cette maladie (Palop and Mucke, 2010 ; Klyubin *et al*, 2012).

A ce stade une question importante se pose: comment les oligomères de A β sont-ils toxiques pour les neurones ? Pour répondre à cette question trois hypothèses ont été formulées :

- Les oligomères de A β interagissent avec les membranes, induisant, par exemple, la formation de pores.
- Les oligomères de A β exercent leurs effets toxiques depuis l'intérieur du neurone.
- Les oligomères de A β se lient à des sites spécifiques de la surface neuronale déclenchant des effets toxiques.

L'hypothèse de la formation des pores, lors de l'interaction de A β avec les membranes, est présentée dans le chapitre 3, section 3.1. Un certain nombre de faits

expérimentaux suggèrent que ces pores permettent le passage de différents ions à travers la membrane. Dans ce contexte, mis à part les ions admis par les pores de A β (chapitre 3, section 3.1), la possibilité du passage des ions chlorure (Cl⁻) à travers ces pores a été évoquée par Arispe et collaborateurs (Arispe et al, 1993) et confirmé quelques années plus tard par Micelli et collaborateurs (Micelli et al, 2004).

Lors de notre étude sur la variation des certains paramètres cellulaires modifiés par la présence du peptide A β 42, une variation de la concentration intracellulaire des ions chlorure ([Cl⁻]_i) dans la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y a été observée. Cette augmentation d'environ 31% de la concentration de [Cl⁻]_i dans les cellules traitées avec 0,5 μ M de A β 42 par rapport aux cellules non traitées (105 \pm 9 mM Cl⁻ et 80 \pm 6 mM Cl⁻ respectivement) « semblerait » être en accord avec le passage de ces ions à travers les canaux formés par A β 42, compte tenu que l'hypothèse des canaux est pleinement acceptée de nos jours et que ces canaux ne sont pas spécifiques quant au passage des ions. Cependant, la seule observation de cette augmentation ne suffit pas pour assurer cette proposition, et d'autres types d'expériences seront nécessaires afin de la confirmer. Par ailleurs, l'interaction de A β 42 avec la membrane plasmique pourrait entraîner une modification dans l'environnement lipidique des transporteurs impliqués, directe ou indirectement dans la régulation de la concentration intracellulaire de chlorure. Une augmentation de la concentration intracellulaire en ion chlorure a également été observée par Zhang et collaborateurs dans des neurones en culture issus d'hippocampe de rat traités avec une concentration de 10 nM de peptide A β (25-35). Ces auteurs observent une augmentation de [Cl⁻]_i d'environ un facteur 3 dans les cellules traitées par rapport aux contrôles (36,1 \pm 3,2 mM Cl⁻ et 11,4 \pm 0,9 mM Cl⁻ respectivement) (Zhang *et al*, 2006).

En raison de l'importance accordée aux ions Cl^- pour la régulation de certains processus cellulaires, les paragraphes qui suivent sont dédiés à exposer l'importance de ces ions et son lien avec la maladie d'Alzheimer.

Dans les cellules, il existe une distribution différentielle des anions à travers la membrane. Au niveau intracellulaire, les anions les plus nombreux sont des molécules organiques chargées négativement, telles que des acides aminés, des protéines et des acides nucléiques ; tandis qu'au niveau extracellulaire, c'est l'anion inorganique Cl^- (Ben-Ari, 2002). Cette accumulation des anions organiques au niveau intracellulaire est équilibrée avec la maintenance d'une distribution inégale des autres ions, dont le chlorure. De cette façon, la cellule arrive à réguler l'osmolarité, une des nécessités pour assurer la survie cellulaire (Friedrich *et al*, 2006).

Dans les neurones présents dans le cerveau d'un adulte, mais aussi dans d'autres types cellulaires, la concentration en chlorure intracellulaire est maintenue à des niveaux constants grâce à l'expression de cotransporteurs de cations/chlorure (CCCs). Les deux CCCs les plus importants au niveau neuronal sont : i) le co-transporteur sodium-potassium-chlorure-1 (NKCC1), qui génère une augmentation de $[\text{Cl}^-]_i$ et ii) le co-transporteur potassium-chlorure-2 (KCC2), responsable de la sortie des ions Cl^- (Ben-Ari, 2002 ; Chamma *et al*, 2012). Les CCCs font face aux flux de Cl^- qui sont transportés par des canaux et qui ont tendance à dissiper le gradient électrochimique transmembranaire du Cl^- (Blaesse *et al*, 2009). Des variations de $[\text{Cl}^-]_i$, même si celles-ci sont faibles, entraînent des variations du volume neuronal qui peuvent être à l'origine de la mort cellulaire. Ces variations peuvent également causer l'altération de l'activité synaptique.

Dans le contexte de cette dernière idée, l'équilibre entre les processus d'excitation et d'inhibition neuronale est absolument nécessaire. Chez les mammifères adultes, la principale

source d'inhibition de l'activité neuronale est l'acide γ -amine-butérique (GABA) tandis que le principal neurotransmetteur excitateur est le glutamate utilisé par les synapses (Ben-Ari, 2002). Pour ces deux neurotransmetteurs, il existe des récepteurs spécifiques dans le neurone.

Dans les neurones des adultes, $[Cl^-]_i$ est faible, et le potentiel électrochimique d'équilibre pour cet ion (E_{Cl}) a une valeur d'environ -75 mV. Cette valeur est très proche à celle du potentiel membranaire de repos (E_{repos} , environ -65 mV). Dans ces conditions, E_{Cl} est plus négatif que E_{repos} , et une entrée des ions Cl^- a lieu en réponse à GABA. L'intérieur neuronal, étant plus négatif suite à cette entrée, le potentiel membranaire est aussi plus négatif. Cela est à l'origine d'une hyperpolarisation entraînant l'inhibition des potentiels d'action. Comme résultat, le neurone entre dans une phase de repos.

A ce stade, et en accord avec nos résultats qui montrent une augmentation de $[Cl^-]_i$, il est possible de suggérer que si cette augmentation est forte et maintenue, l'inhibition des potentiels d'action serait prolongée et par conséquent les synapses se verraient modifiées, altérant l'activité neuronale pouvant contribuer à la mort cellulaire observée lors de la maladie d'Alzheimer.

Concernant le neurotransmetteur glutamate (Glu), dans des conditions physiologiques, ce neurotransmetteur stimule des récepteurs ionotropiques présents dans les membranes neuronales, causant l'entrée des cations ; principalement K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . L'entrée de ces cations rend moins négatif (ou plus positif) le potentiel membranaire. Contrairement à ce qui a été déjà décrit pour le GABA, ceci entraîne une dépolarisation pouvant être le déclencheur de potentiels d'action, excitant les neurones.

De façon intéressante, Zhang et collaborateurs ont observé une diminution de la viabilité des neurones d'hippocampe de rat traités avec 10 nM de $A\beta(25-35)$ et exposés pendant 10 minutes à une concentration de 10 μM de glutamate par rapport aux cellules sans

aucun traitement. D'autre part, si les neurones étaient cultivés en présence de A β (25-35), mais dans un milieu pauvre en chlorure, aucun effet de l'exposition ultérieure au glutamate n'était observée (Zhang *et al*, 2006). Ces résultats suggèrent deux choses : i) la toxicité du glutamate induite par A β (25-35) dépend de [Cl]_i, et ii) une faible valeur de [Cl]_i peut protéger les neurones des effets du glutamate (Zhang *et al*, 2006).

D'après les idées qui ont été présentées, une augmentation de [Cl]_i pourrait entraîner deux effets : i) une dérégulation du volume neuronal suite à l'entrée osmotique d'eau, et, ii) une stimulation cytotoxique des récepteurs du glutamate par ce neurotransmetteur. Si ces deux effets sont synergétiques ou non et si chacun des effets est suffisant pour produire la mort neuronale, est, à ce jour, méconnu. Etant donnée l'importance des ions chlorure dans la physiologie neuronale, des travaux de recherche dans ce sens s'avèrent donc nécessaires.

Dans le cadre de la variation de certains paramètres physiologiques liée à l'interaction de A β 42 avec les cellules, l'intérêt s'est aussi porté sur le potentiel de la membrane mitochondriale (Ψ_{mit}). Afin de comprendre l'importance du bon fonctionnement de la mitochondrie, une explication générale sur les principaux processus faisant intervenir cet organite sera d'abord présentée, suivi du lien entre les résultats expérimentaux obtenus lors de la mesure du Ψ_{mit} et le fonctionnement de la mitochondrie.

D'après la description présentée dans le chapitre 3 (section 3.2.2), la génération d'ATP dans la mitochondrie est accomplie grâce à l'utilisation de la force proton-motrice (Δp). Cette force résulte d'une combinaison du potentiel membranaire mitochondrial (Ψ_{mit}) et du gradient de pH produit par le gradient de concentration de protons (H⁺) (ΔpH_{mit}) lors du transport d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire. Ces facteurs participent au contrôle du métabolisme énergétique mitochondrial, l'homéostasie des ions intracellulaires et la mort cellulaire. Concrètement, le composant Ψ_{mit} pourvoit le gradient électrique nécessaire pour la

séquestration mitochondriale des ions Ca^{2+} et la production de ROS; étant de cette façon un régulateur de la viabilité cellulaire, vue l'importance du Ca^{2+} dans le développement de nombreux processus cellulaires (Nichols and Ward, 2000 ; Perry et al, 2011). Nos résultats montrent une modification du Ψ_{mit} dans les cellules neuronales incubées en présence du peptide A β 42. Cette modification peut être à l'origine d'une production majeure des ROS mais aussi d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), suite à la libération du Ca^{2+} contenu dans la mitochondrie. Une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ altère les voies de signalisation où cet ion joue un rôle prépondérant mais modifie aussi le balance électrique dans le neurone, deux facteurs nécessaires pour la transmission de l'information au sein du SNC. Ces altérations peuvent conduire à la mort du neurone. De plus, si Ψ_{mit} est modifié, Δp le sera aussi par la suite. Par conséquent, la production de l'ATP nécessaire pour le bon fonctionnement du neurone se voit modifiée, conduisant à la mort cellulaire par nécrose (Duchen, 2005).

L'ensemble de ces résultats, à savoir, l'augmentation de la $[\text{Cl}^-]_i$ et la modification du Ψ_{mit} , suggèrent que ces événements peuvent être induits par le peptide A β 42. Il reste à savoir quelle est la contribution réelle de ces deux paramètres dans la mort neuronale observée lors de la maladie d'Alzheimer, cette connaissance pourrait ouvrir des portes pour la conception d'un diagnostic précoce de la maladie ainsi que pour le traitement des patients.

□

□

□

**Chapitre 7 : Modulation
de l'efflux de la
Pirarubicine par des
molécules susceptibles
d'inhiber le
fonctionnement de la
P-glycoprotéine**

7.1.1.- Contexte

En chimiothérapie, un problème extrêmement important est de comprendre comment les cellules tumorales deviennent résistantes aux médicaments utilisés lors du traitement. Au moins deux classes de résistance peuvent être définies :

- La résistance intrinsèque, c'est-à-dire, celle qui amène les tumeurs et/ou les microorganismes à ne pas répondre, dès le début du traitement, aux différents médicaments.
- La résistance acquise : les cellules répondent positivement au traitement initial mais deviennent résistantes à mesure que ce même traitement se prolonge. Dans ce cas, les cellules deviennent résistantes non seulement au médicament utilisé initialement mais également à d'autres n'ayant aucune relation ni de structure, ni de propriété cytotoxiques. C'est ce qu'on appelle la résistance multiple aux médicaments (MDR pour *Multidrug resistance*). Les cellules qui la développent présentent une série de caractéristiques communes (Simon and Schindler, 1994 ; Teodori *et al*, 2000):
 1. Une réduction de l'accumulation intracellulaire des différents médicaments censés être cytotoxiques.
 2. Une variation de l'activité et/ou de l'expression de protéines cellulaires telles que P-gp, MRP (pour *MDR-associated protein*), glutathion S-transférase, protéine kinase C (PKC), topo isomérase II, etc.
 3. Une altération de la physiologie cellulaire entraînant des changements de la structure de la membrane plasmique, du pH du cytosol, de la structure des lysosomes, etc.

Ces caractéristiques, obtenues à partir des observations, ont débouché à la proposition de nombreux modèles visant à expliquer le phénomène de la résistance multiple aux médicaments. Le but de cette section n'étant pas de tous les décrire, nous conseillons au

lecteur de consulter l'article de revue de Simon et Schindler (1994). Cependant, nous retenons pour cette partie le modèle de l'efflux actif des médicaments utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP et dans lequel un rôle primordial a été attribué à la P-gp et à d'autres protéines similaires. L'identification du transporteur P-gp, comme l'un des responsables de la résistance, a ouvert le champ d'étude à une ample variété de molécules afin de déterminer quelles étaient les caractéristiques propres aux molécules, d'une part pouvant être transportées ou, d'autre part, exercer un effet modulateur sur son activité. Cela a contribué à proposer des stratégies afin de cibler cette activité d'efflux. De nombreuses molécules ont donc été proposées afin d'inhiber l'efflux des médicaments par la P-gp et augmenter la biodisponibilité des médicaments, rendant finalement plus efficace les chimiothérapies.

Il est possible d'inhiber l'activité de la P-gp via 3 mécanismes (Amin, 2013) :

1. Le blocage du site auquel le médicament s'unit en tant que substrat. Ceci est possible en administrant en même temps que le médicament, des inhibiteurs qui auront plus d'affinité pour ce site que le médicament lui-même (voir Figure 41).
2. Le blocage de l'hydrolyse d'ATP, événement nécessaire pour l'efflux de la drogue.
3. L'altération de la stabilité de la membrane plasmique.

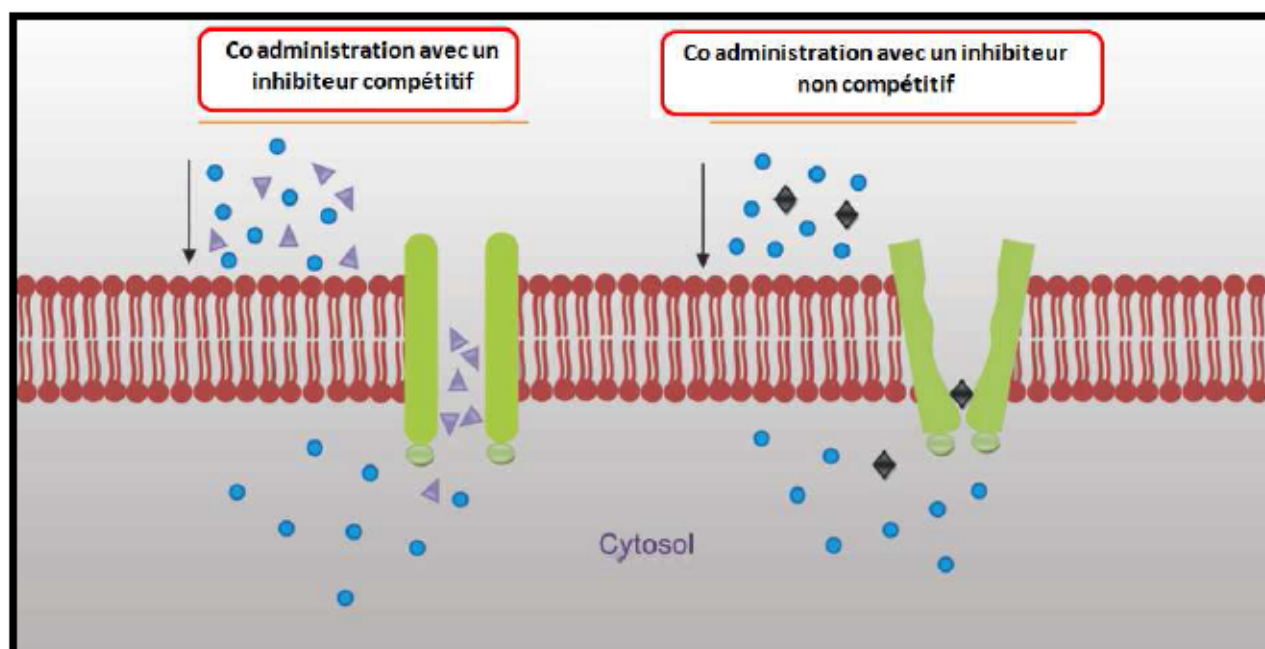


Figure 41. Deux façons d'inhiber l'efflux de médicaments par la P-gp : la coadministration du médicament avec des inhibiteurs compétitifs ou non compétitif. Le médicament est représenté avec des cercles bleus, l'inhibiteur compétitif avec des triangles violet et l'inhibiteur non compétitif avec des rhombes noirs. D'après Amin, 2013.

Dans ce contexte, la conception des molécules inhibitrices est la stratégie la plus étudiée et a mené à caractériser trois générations d'inhibiteurs en fonction de sa toxicité, son affinité et sa spécificité (Amin, 2013 ; Teodori *et al*, 2002 ; Krishna and Mayer, 2000 ; Szacacs *et al*, 2006 ; Thomas *et al*, 2003):

- a. Les modulateurs de première génération sont généralement utilisés pour traiter des maladies spécifiques mais en même temps montrent un effet inhibiteur sur la P-gp. Dans ce groupe se trouvent le vérapamil, un inhibiteur des canaux calciques (Tsuruo *et al*, 1981), la nicardipine, la nifédipine et le diltiazem (Tsuruo *et al*, 1983). Cependant l'utilisation de ces inhibiteurs est limitée par leurs effets secondaires.
- b. Les modulateurs de deuxième génération sont de nouvelles molécules synthétisées afin d'obtenir une meilleure affinité pour la P-gp ainsi qu'une

toxicité réduite par rapport à ceux de première génération. On peut citer dans ce groupe les analogues du vérapamil : dextrémapamil, émapamil, gallopamil et bien d'autres. Cependant, malgré l'amélioration de l'affinité de l'inhibiteur pour la P-gp, le problème de sa spécificité pour ce transporteur demeure.

- c. Les inhibiteurs de troisième génération sont développés suite à des études de relation structure-activité par des approches de synthèse chimique. Ils exhibent une grande spécificité, une faible toxicité et il est possible de les utiliser à des concentrations de l'ordre des nanomolaire.

Dans ce contexte, parallèlement aux études sur la modification des paramètres physiologiques induites par A β 42 et la vérification expérimentale des différents critères, souvent employés pour définir une molécule comme substrat de la P-gp, une étude portant sur l'effet d'une série des molécules, dérivées du vérapamil, synthétisées suivant le critère structure-activité sur l'inhibition de l'efflux de la Pirarubicine, a été effectuée en collaboration avec le groupe de recherche du Professeur Elisabetta Teodori du Département des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Florence (Italie) (Orlandi *et al*, 2013). Ces inhibiteurs ont été synthétisés par ce groupe suite à des données expérimentales obtenues à partir de travaux précédents publiés par ce même groupe. Nous avons étudié la capacité de chacune de ces nouvelles molécules synthétiques à inhiber l'efflux de la Pira.

L'intérêt dans la réalisation de cette étude est lié au fait que la BHE est le principal obstacle pour le développement de médicaments dirigés vers le système nerveux central (SNC). La maladie d'Alzheimer étant une pathologie qui affecte ce système, des efforts ont été faits afin de concevoir des traitements efficaces. Ainsi, des traitements ont été conçus pour cibler certains acteurs moléculaires à l'origine de cette maladie : i) réduction de la production de A β via, par exemple, l'inhibition des β et γ sécrétases (Pardridge, 2009 ; Ghosh *et al*, 2010); ii) augmentation de l'élimination de A β au sein de la BHE (Citron, 2010) ; iii)

synthèse de petites molécules pouvant empêcher les interactions A β -A β (Citron, 2010). Le principal problème associé à ces stratégies est le passage de ces molécules à travers la BHE.

Parmi les molécules de petite taille, c'est-à-dire de poids moléculaire souvent inférieur à 400 Da, conçues pour le traitement des maladies du SNC, plus de 98% ne peuvent pas traverser la BHE. Il en est de même pour la presque totalité des grandes molécules obtenues par biotechnologie (Pardridge, 2009). Ces résultats inquiétants sont principalement dus à la perméabilité très restreinte de la BHE ainsi qu'aux mécanismes d'élimination des substances, parmi lesquels se trouvent des pompes d'efflux, dont la P-gp.

De nombreuses stratégies sont étudiées de nos jours afin d'améliorer les caractéristiques de ces molécules, visant à les rendre capables de traverser la BHE: synthèse de molécules avec un poids moléculaire inférieur à 400 Da, ayant peu de groupes polaires et une lipophilie plus grande. Ces modifications contribuent au passage des molécules mais génère d'autres contraintes. L'une d'entre elles est la perte de l'effet dans le CNS pour lequel la molécule a été conçue. Une autre, et peut être la plus importante, est que l'augmentation de la lipophilie peut faire que la molécule soit un substrat de la P-gp et par conséquent soit effluée vers le sang, n'atteignant pas sa cible (Gabathuler, 2010).

Dans ce contexte, l'inhibition de la P-gp est une des stratégies proposées afin de rendre plus « perméantes » les molécules à but thérapeutique pour le traitement des maladies au niveau du CNS. Ainsi, dans cette partie du travail nous nous sommes impliqués dans l'étude de nouveaux inhibiteurs de la P-gp.

7.1.2.- Méthodologie

Basés sur des travaux précédents, l'équipe du Professeur Teodori a synthétisé des dérivés du vérapamil dans lesquels la partie N,N-bis(cyclohexanol)amine est conservée mais est, cette fois, couplée à des groupes fonctionnels qui rendent la molécule moins flexible et par conséquent plus rigide, permettant ainsi de renforcer l'interaction des inhibiteurs avec la P-gp. Cette série d'inhibiteurs comporte une estérification de la partie N,N-bis(cyclohexanol)amine avec différents acides. L'estérification est à l'origine de 4 isomères géométriques : i) cis/trans, ii) trans/trans, iii) cis/cis et iv) trans/cis (tableau VIII). Suite à ces réactions d'estérification, dans un premier temps, quatre séries de composés ont été obtenus par l'équipe du professeur Teodori (séries 2 à 5, figure 42) à partir de la variation des groupements du composé modèle de la série 1 ; chacune d'entre elles ayant les quatre isomères mentionnés auparavant (Tableau VIII).

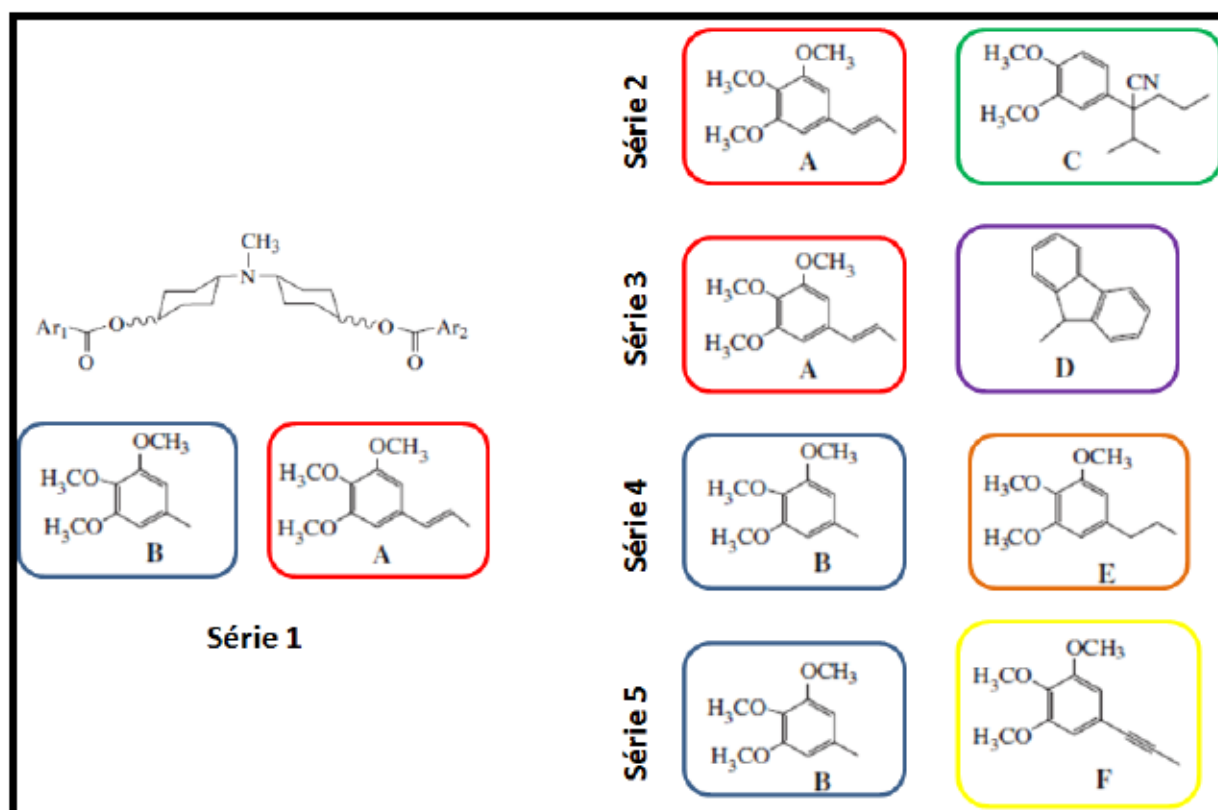


Figure 42. L'estérification avec différents acides de la partie *N,N*-bis(cyclohexanol)amine de la molécule modèle de la série 1 est à l'origine des séries 2 à 5. Les endroits de la molécule, où les substitutions ont été faites sont indiqués Ar_1 et Ar_2 . Pour toutes les séries, le groupement se trouvant à gauche occupe la position Ar_1 tandis que celui situé à droite occupe la position Ar_2 . Différentes couleurs ont été utilisées pour encadrer les groupements afin de faciliter la compréhension des endroits de la molécule où les substitutions ont été faites.

En fonction des résultats obtenus pour ces quatre premières séries, l'équipe du professeur Teodori a procédé à la synthèse d'une nouvelle série de composés à partir de variations de celui de la série 5 (séries 6 et 7, figure 43)

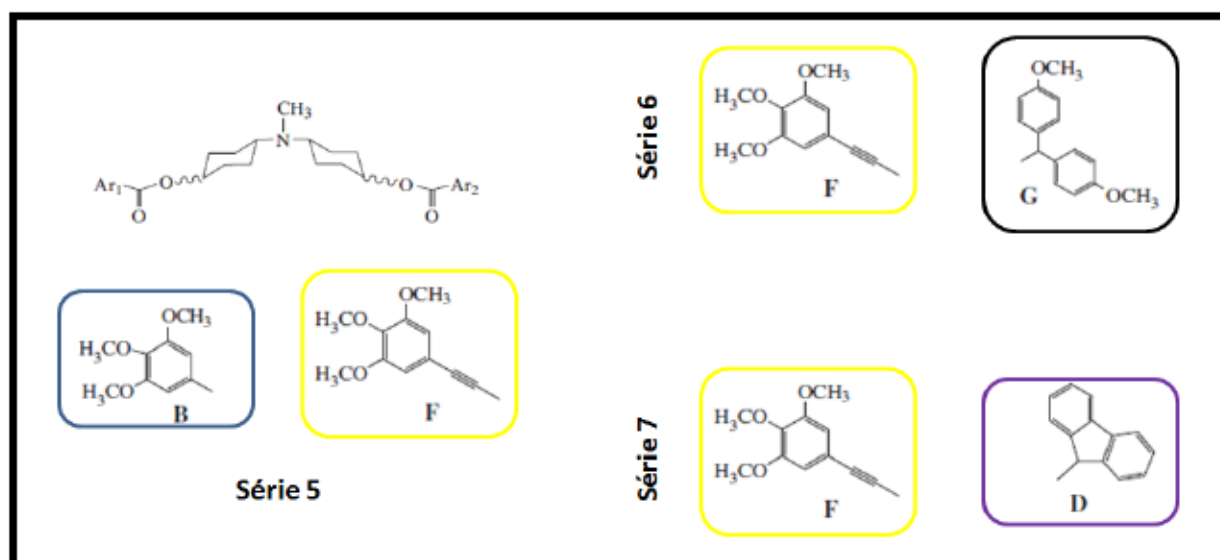


Figure 43. L'estérification avec différents de la partie *N,N*-bis(cyclohexanol)amine de la molécule modèle de la série 5 est à l'origine des séries 6 et 7. Les endroits de la molécule où les substitutions ont été faites sont indiqués Ar_1 et Ar_2 . Pour les deux séries, le groupement se trouvant à gauche occupe la position Ar_1 tandis que celui situé à droite occupe la position Ar_2 . Différentes couleurs ont été utilisées pour encadrer les groupements afin de faciliter la compréhension des parties de la molécule où les substitutions ont été faites.

Différentes combinaisons ont été aussi obtenues. L'effet de ces modifications ainsi que l'impact de la stéréo-isomérisie sur la capacité de chaque molécule à inhiber l'efflux de la Pira par la P-gp ont été étudiés. Cette activité inhibitrice a été étudiée en fonction de concentrations croissantes des différents inhibiteurs, la concentration du substrat Pira étant toujours la même.

Les expériences ont été réalisées sur des cellules de la lignée K562/ADR sur-exprimant la P-gp. Les mesures de fluorescence ont été réalisées de la façon suivante :

Les cellules, placées dans une cuvette de quartz de 1 cm^2 de section et à une concentration de 1×10^6 cellules/ml, sont incubées dans du tampon HEPES/ Na^+ avec 5 mM de glucose, sous agitation à une température de 37°C . A $t = 0$, une concentration C_T de Pira

(1 μM) est rapidement ajoutée et le signal fluorescent est alors F_0 . L'incorporation de la drogue est suivie par la diminution de son signal de fluorescence (F).

Pour étudier l'effet d'un inhibiteur sur l'incorporation de la Pira, les cellules ont été incubées, comme indiqué ci dessus, mais cette fois-ci en présence de différentes concentrations d'inhibiteur à tester. Lorsqu'une concentration $[I]$ d'inhibiteur est ajoutée, une diminution plus importante du signal fluorescent est observée comparée au contrôle où les cellules sont incubées sans inhibiteur (Figure 44). Cette diminution de fluorescence traduit une augmentation de l'accumulation intracellulaire de la Pira d'autant plus prononcée que l'inhibition du transporteur est importante.

Pour des faibles concentrations d'anthracyclines, inférieures à 12 μM (la concentration utilisée lors de notre étude est de 1 μM), l'intensité du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration d'anthracycline. A l'état stationnaire, la concentration globale de drogue intercalée entre les paires de base de l'ADN est $C_n = C_T (F_0 - F_n)/F_0$, où F_n correspond au signal de fluorescence. La concentration de drogue libre dans le milieu extracellulaire est $C_e = C_T - C_n$.

Le Triton X-100, perméabilise les membranes cellulaires et amène à un état d'équilibre où la valeur de la fluorescence est F_N , la concentration globale de drogue intercalée entre les paires de base de l'ADN est alors $C_N = C_T (F_0 - F_N)/F_0$.

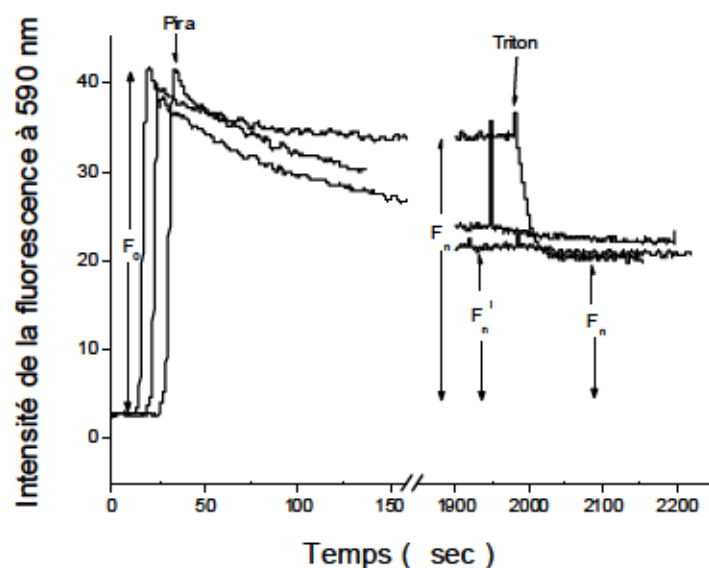


Figure 44. Incorporation de la Pirarubicine dans des cellules K562/ADR en présence des inhibiteurs de la P-gp. Typiquement 10^6 cellules/ml sont incubées avec une concentration C_T de pirarubicine et l'extinction du signal de fluorescence est suivie à 590 nm en fonction du temps. Trois cinétiques sont montrées : (a) En absence d'inhibiteur, (b) en présence d'une concentration faible d'inhibiteur, (c) en présence d'une concentration plus forte d'inhibiteur.

En 1991, Frézard et Garnier-Suillerot ont montré que la concentration intracellulaire de la molécule C_i , peut être calculée par la relation $C_i = C_n \cdot (C_E/C_N)$, où C_N représente la concentration globale d'anthracycline fixée à l'ADN et $C_E = C_T - C_N$ sa concentration extracellulaire après l'addition du Triton X-100.

7.1.3.- Expression des résultats

L'activité inhibitrice de chaque molécule, exercée sur la P-gp, a été exprimée en fonction de la fraction d'inhibition calculée à partir des données de variation du signal fluorescent de la Pira à $\lambda_{\text{émission}} = 580 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{excitation}} = 490 \text{ nm}$).

A l'état stationnaire l'intensité du signal fluorescent en présence de l'inhibiteur F_n^I et la concentration de Pira dans le noyau est :

$C_n^I = C_T (F_0 - F_n^I) / F_0$. La Fluorescence F_n^I est plus faible que F_n (sans inhibiteur).

La fraction d'inhibition est définie par le rapport α où :

$$\alpha = (C_n(0) - C_n) / (C_N - C_n)$$

α est compris entre 0 (aucune efficacité) et 1 (réversion totale).

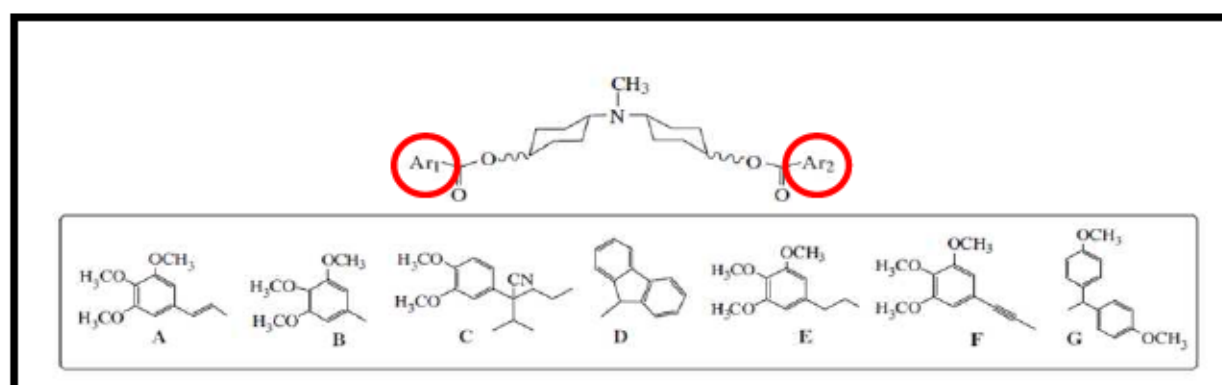
La fraction α a été calculée pour les différentes concentrations d'un modulateur I , et la concentration correspondant à $\alpha = 0,5$ (c'est à dire la concentration donnant 50% d'inhibition) a été déterminée pour chaque composé $[I_{0,5}]$.

7.2.- Résultats

Les résultats obtenus de l'effet de différentes concentrations de chaque inhibiteur sur l'efflux de la pirarubicine mené par la P-gp sur la lignée cellulaire K562/ADR ainsi que pour le vérapamil (substrat standard de la P-gp) sont présentés dans le tableau VIII en fonction des paramètres décrits dans la section 7.1.3. On observe que, à l'exception du composé 4c (tableau VIII), les composés synthétisés ont des valeurs de $[I]_{0,5}$ de l'ordre de μM ou même

nM, indiquant qu'ils possèdent une bonne activité inhibitrice de l'efflux de la pirarubicine par la P-gp. Pour la totalité des composés, les valeurs de $[I]_{0,5}$ sont inférieures à celle du vérapamil ($1,60 \pm 0,3 \mu\text{M}$), les valeurs étant de 0,68 à 133 fois plus faibles que celle du vérapamil. Ceci signifie que ces molécules ont une bonne efficacité en tant que modulateurs de la P-gp. Parmi les composés testés, certains montrent des valeurs du paramètre α_{max} très proches de 1, ce qui signifie une forte accumulation de la Pirarubicine dans le noyau (composés 2b, 2c, 3d, 5a, 5b, 5c, 5d et 6d ; tableau VIII).

Tableau VIII. Activité des molécules inhibitrices de la résistance aux drogues multiples



	Groupe Aryle 1	Groupe Aryle 2	[I] _{0,5} μM	α _{max}
1a cis/trans	B	A	0,092 ± 0,015	0,85 ± 0,03
1b trans/trans	B	A	0,32 ± 0,10	0,81 ± 0,03
1c cis/cis	B	A	0,03 ± 0,01	0,80 ± 0,02
1d trans/cis	B	A	0,012 ± 0,001	0,98 ± 0,03
2a cis/trans	A	C	0,24 ± 0,04	0,88 ± 0,03
2b trans/trans	A	C	0,14 ± 0,02	0,99 ± 0,01
2c cis/cis	A	C	0,15 ± 0,03	0,99 ± 0,01
2d trans/cis	A	C	0,08 ± 0,03	0,89 ± 0,05
3a cis/trans	A	D	0,08 ± 0,01	0,81 ± 0,03
3b trans/trans	A	D	0,075 ± 0,01	0,94 ± 0,04
3c cis/cis	A	D	0,18 ± 0,04	0,90 ± 0,03
3d trans/cis	A	D	0,15 ± 0,03	0,99 ± 0,01
4a cis/trans	B	E	0,63 ± 0,02	0,75 ± 0,03
4b trans/trans	B	E	0,61 ± 0,18	0,76 ± 0,03
4c cis/cis	B	E	1,10 ± 0,3	0,76 ± 0,05
4d trans/cis	B	E	0,35 ± 0,1	0,77 ± 0,02
5a cis/trans	B	F	0,08 ± 0,01	0,98 ± 0,02
5b trans/trans	B	F	0,07 ± 0,01	0,99 ± 0,01
5c cis/cis	B	F	0,07 ± 0,01	0,99 ± 0,01
5d trans/cis	B	F	0,02 ± 0,01	0,99 ± 0,01
6a cis/trans	F	G	0,13 ± 0,03	0,76 ± 0,03
6b trans/trans	F	G	0,14 ± 0,04	0,74 ± 0,02
6c cis/cis	F	G	0,12 ± 0,04	0,94 ± 0,04
6d trans/cis	F	G	0,02 ± 0,001	0,99 ± 0,01
7a cis/trans	F	D	0,12 ± 0,04	0,96 ± 0,04
7b trans/trans	F	D	0,50 ± 0,07	0,77 ± 0,02
7c cis/cis	F	D	0,05 ± 0,01	0,89 ± 0,05
7d trans/cis	F	D	0,29 ± 0,08	0,91 ± 0,06
Verapamil			1,6 ± 0,3	0,70 ± 0,07

7.3.- Discussion

Dans le but de trouver des molécules ayant une forte capacité à inhiber l'activité d'efflux de la P-gp, 24 isomères géométriques ont été synthétisés, à partir des résultats obtenus précédemment pour les molécules correspondantes à la série 1, par l'équipe du professeur Teodori. Des résultats préliminaires sur cette série ont été publiés en 2009 (Martelli *et al*, 2009).

Si on compare l'effet de la géométrie des isomères sur l'inhibition de la P-gp, les valeurs les plus faibles du paramètre $[I]_{0,5}$ sont obtenues pour la géométrie *trans/cis* dans la plupart des séries (composés 1d, 2d, 3d, 5d et 6d). Cette première analyse, suggère que cette géométrie est la plus propice à une meilleure interaction avec le site actif de la P-gp. Cependant, une observation des valeurs les plus faibles de $[I]_{0,5}$ pour les autres géométries à l'intérieur de ces séries révèle des différences dans l'efficacité inhibitrice allant de 2 fois (série 3, composé 3a vs 3d) à 8 fois (série 1, composé 1a vs 1d) c'est-à-dire, de faibles différences. Par conséquent, le seul critère de la géométrie des dérivés ne peut être utilisé pour généraliser l'influence de ce paramètre dans la modulation de l'activité de la P-gp.

Si l'analyse des données présentées dans le tableau VIII est réalisée en fonction des acides utilisés pour les réactions d'estérification à l'origine des composés appartenant aux séries 2 à 3, où la partie acide 3,4,5-trimethoxybenzoïque est substitué par 4-cyano-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-methylpentyl (série 2) ou 9H-fluorene (série 3), des variations peu importantes entre les valeurs de $[I]_{0,5}$ des deux séries sont observées.

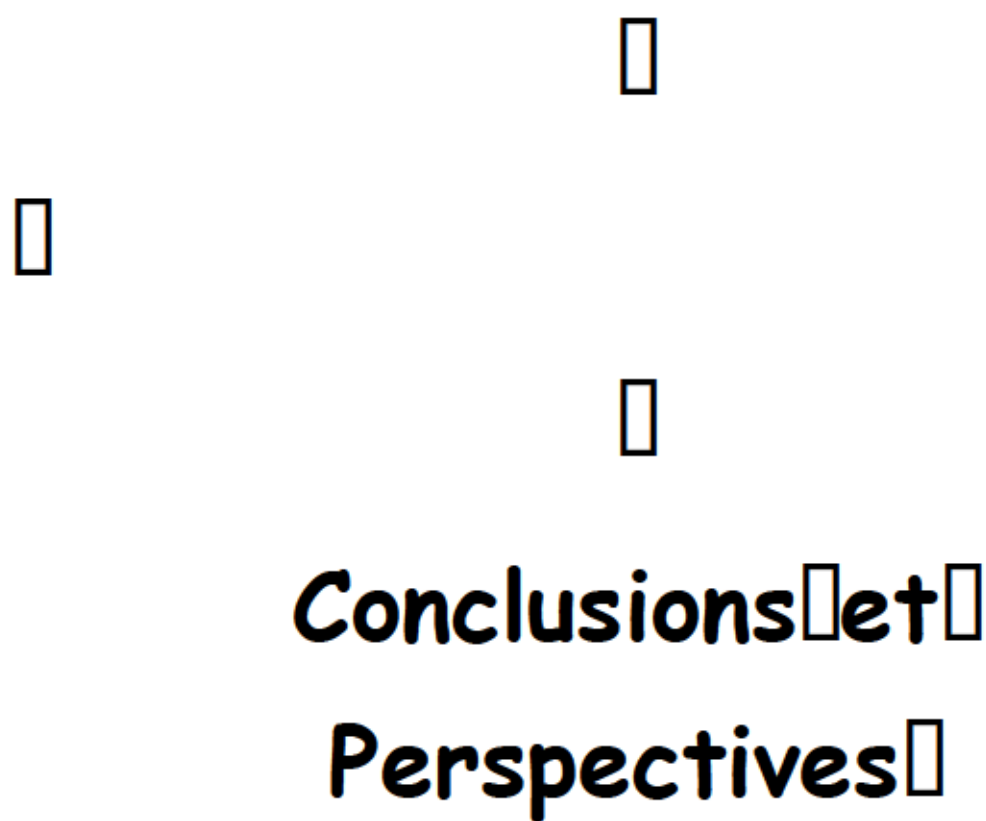
Si cette même analyse est effectuée pour les séries 4 et 5, où la partie acide *trans*-3(3,4,5 trimethoxyphenyl) acrylique contenant une double liaison est substitué par acide 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoïque (série 4), ou l'acide 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propiolique contenant une triple liaison (série 5), des variations très importantes des valeurs

de $[I]_{0,5}$ entre les composés de ces deux séries sont observées. Les valeurs de $[I]_{0,5}$ suggèrent que l'élimination de la double liaison contenue dans l'acide trans-3(3,4,5 trimethoxyphenyl) acrylique, présent dans la série 1, entraîne une diminution de l'efficacité des inhibiteurs appartenant à la série 4 par rapport à ceux de la série 1 ; tandis que l'introduction de l'acide 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propiolique améliore considérablement l'activité des inhibiteurs de la série 5 par rapport à ceux de la série 1 et à ceux de la série 4. D'après ces résultats, il est possible de suggérer qu'une diminution de la rigidité moléculaire est associée à une liberté plus grande de la molécule pour des changements conformationnels. Ceci se traduit par une diminution de la capacité de la molécule à interagir avec le site actif de la P-gp, entraînant une perte de l'efficacité de son activité inhibitrice. Au contraire, l'introduction d'une triple liaison augmente la rigidité de la molécule, restreignant les changements de conformation. Ceci permet à la molécule une meilleure interaction avec le site actif de la P-gp, augmentant de cette façon sa capacité inhibitrice.

Parmi les quatre séries mentionnées (séries 2, 3, 4 et 5), les meilleures valeurs de $[I]_{0,5}$ sont observées pour la série 5. Afin de continuer dans la recherche des caractéristiques géométriques, deux séries supplémentaires ont été synthétisées à partir de la série 5 (séries 6 et 7). La rigidité des molécules a été modifiée grâce à l'élimination de l'acide 3,4,5-trimethoxybenzoïque présent dans les molécules de la série 5 et l'introduction de l'acide 2,2-bis(4-methoxyphenyl) acétique (série 6) ou le 9H-fluorene, considéré comme un analogue des groupes apportant de la rigidité (série 7). Dans ce cas, la flexibilité des molécules a eu des effets différents dans l'activité des isomères. L'isomère le plus efficace dans la série 6 est celui de géométrie trans/cis (6d, $[I]_{0,5} = 0,02 \pm 0,001 \mu\text{M}$), tandis que pour la série 7 c'est celui de géométrie cis/cis (7c, $[I]_{0,5} = 0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$). Il semblerait que la rigidité moléculaire dans ces deux séries affecte de manière moins importante l'activité inhibitrice. En même temps, le mode d'union des acides paraît modifier l'efficacité des inhibiteurs, 6d et 7c

ayant la meilleure activité des deux pour la géométrie trans/cis. Nonobstant, les différences entre ces deux isomères sont aussi faibles que celles existantes pour les isomères 1d, 2d, 3d, 5d et 6d mentionnés au début de cette dissertation.

Ces résultats suggèrent que la flexibilité des molécules semble être un facteur important pour le mode d'union au site actif de la P-gp, faisant des molécules les moins flexibles plus efficaces modulateurs de la P-gp.



Cette étude a été réalisée dans le but d'approfondir les connaissances ayant trait aux interactions du peptide A β 42 avec les membranes cellulaires conduisant aux événements physiopathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Ces interactions ont été étudiées selon: i) le transport du peptide A β 42 à travers les membranes, dans lequel la participation du transporteur ABC P-gp a été évoquée par certaines études et, ii) la modification de certains paramètres cellulaires suite à ces interactions.

Concernant le processus d'élimination du peptide A β 42 par la P-gp, nos résultats suggèrent que dans nos conditions expérimentales et avec le modèle cellulaire utilisé, ce transporteur ne prend pas en charge le peptide A β 42. Cette affirmation s'appuie sur les faits suivants : i) nous n'avons pas observé dans des vésicules de membrane, une stimulation de l'activité ATPase de la P-gp en présence du peptide A β 42 ; ii) aucune modification de la vitesse d'efflux d'un substrat de la P-gp, la pirarubicine, n'a été observée en présence du peptide amyloïde.

Aux observations mentionnées auparavant s'ajoute un troisième fait : l'absence de différences entre la mortalité cellulaire induite par le peptide A β 42 sur les lignées cellulaires K562/ADR et K562 surexprimant ou non la P-gp. Si une diminution dans l'expression de la P-gp est évoquée comme un facteur déclencheur de l'accumulation des peptides A β , nos observations permettent de suggérer que la seule surexpression du transporteur n'est pas suffisante pour une diminution de la toxicité cellulaire entraînée par le peptide A β 42.

Nos observations s'avèrent donc contraires à certains travaux de recherche suggérant une participation de la P-gp dans l'efflux du peptide A β au niveau la BHE mais sont aussi en harmonie avec d'autres études mettant en question le fait du transport de A β par la P-gp. Par ailleurs, de par les caractéristiques et propriétés physico-chimiques du peptide A β 42 ainsi que par les caractéristiques et le fonctionnement de la P-gp en tant que transporteur décrites à ce

jour, un efflux de A β 42 effectué par celui-ci ne semble pas être possible. Cependant, la possibilité d'un transport de produits de dégradation du peptide A β 42 par la P-gp ne peut être exclue. A ce titre, une étude sur le transport des petites séquences du peptide A β pourrait être utile afin de vérifier cette hypothèse.

En conclusion, nos résultats suggèrent le non contribution de la P-gp à l'efflux du peptide A β 42 intact. Par ailleurs, si un efflux du peptide a lieu, celui-ci peut être réalisé via d'autres molécules non identifiées de nos jours.

D'après l'hypothèse de la cascade amyloïde, suite à une défaillance des processus de production et d'élimination des peptides A β , survient la mort neuronale observé dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. Bien que l'idée générale proposée dans cette hypothèse soit acceptée, la succession d'événements conduisant à la mort neuronale due à l'accumulation des peptides A β 42 est encore un sujet à explorer. Dans cet esprit, au-delà du simple fait d'avoir observé une mort cellulaire dépendante des concentrations du peptide A β 42 utilisées, notre intérêt s'est aussi porté sur la variation de deux paramètres cruciales pour la survie cellulaire avant que la mort ait lieu. A ce titre, nos résultats suggèrent une augmentation de la concentration intracellulaire des ions chlorure (anions essentiels pour la régulation du volume cellulaire ainsi que pour la neurotransmission) et une altération du potentiel membranaire sur la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y suite à sa culture en présence de 0,5 μ M du peptide A β 42. Ces deux altérations sont censées produire la mort neuronale. Cependant, cette morte neuronale suite à l'interaction des peptides A β avec les membranes peut être induite de plusieurs manières, faisant impossible de la circonscrire à l'altération d'un seul procès cellulaire. Des études d'une part destinées à approfondir quels sont les processus cellulaires directement altérés par le peptide A β 42 sont nécessaires. D'autre part, une fois établie cette cartographie, il est nécessaire d'évaluer la contribution réelle de chacun de ces processus à la mort neuronale. L'ensemble de ces connaissances s'avère donc

utile non seulement pour comprendre la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer mais pour concevoir des traitements ciblés à reverser les processus cellulaires modifiés.

La P-gp étant un transporteur lié, en grande partie, à la résistance des cellules aux médicaments, la connaissance des caractéristiques moléculaires des substrats peut aboutir à deux objectifs: i) une meilleure compréhension des interactions des molécules avec la P-gp et, ii) dans le cas de conception de nouveaux traitements destinés à guérir la maladie d'Alzheimer, permettre de concevoir des molécules capables d'inhiber la P-gp et ainsi de faciliter le passage vers le cerveau de médicaments qui pourraient être efficaces mais dont l'entrée serait impossible à cause de la présence de la P-gp. C'est dans ce contexte qu'une partie de cette thèse a été consacré à étudier l'effet de différents inhibiteurs dérivés du vérapamil sur la P-gp.

□

□

□

□

Références□ Bibliographiques□

1. ABBOTT, N; PATABENDIGE, A; DOLMAN, D; YUSOF, S; BEGLEY, D (2010). Structure and Function of the Blood-Brain Barrier. *Neurobiol Dis.* 37: 13-25
2. ABUZNAIT, A; CAIN, C; INGRAM, D; BURK, D; KADDOUMI, A (2011). Up-regulation of P-Glycoprotein reduces intracellular accumulation of β -amyloid: investigation of P-glycoprotein as a novel therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol.* 63(8): 1111-1118
3. AL-SHAWI, M; POLAR, M; OMOTE, H; FIGLER, R (2003). Transition State Analysis of the Coupling of Drug Transport to ATP Hydrolysis by P-Glycoprotein. *J Biol Chem.* 278(52): 52629-52640
4. AMBUDKAR, S; KIM, I-W; SAUNA, Z (2006). The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharmaceut Sci* 27: 392-400
5. AMIN, L (2013). P-Glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* 7: 27-34
6. ANDERSON, R; VASILE, E; MELLO, R; BROWN, M; GOLSTEIN, J (1978). Immunocytochemical visualization of coated pits and vesicles in human fibroblasts: Relation to Low Density Lipoprotein Receptor distribution. *Cell* 15(3): 919-933
7. ANDREWS, Z; DIANO, S; HORVATH, T (2005). Mitochondrial Uncoupling Proteins in the CNS: In support of function and survival. *Nat Rev Neurosci* 6: 829-840
8. ANDRUSS, M; LEPORE, S (1997). Synthesis of stipiamide and a new multidrug resistance reversal agent, 6,7-Dehydrostipiamide. *JACS* 119: 2327-2328
9. ARAKAWA, T; KITA, Y; TIMASHEFF, S (2007). Protein precipitation and denaturation by Dimethyl Sulfoxide. *Biol Chem.* 131: 62-70

10. ARISPE, N; ROJAS, E; POLLARD, H (1993a). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 567-571
11. ARISPE, N; POLLARD, H; ROJAS, E (1993b). Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid β -protein [(A β P 1-40)] in bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10573-10577
12. ARISPE, N; POLLARD, H; ROJAS, E (1994). The Ability of Amyloid β -Protein [A β P(1-40)] to form Ca²⁺ channels provides a mechanism for neuronal death in Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 747: 256-266
13. ARISPE, N; DIAZ, JC; SIMAKOVA, O (2007). A β ion channels. Prospects for treating Alzheimer's Disease with A β channels blockers. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1952-1965
14. ARMSTRONG, R (2011). The Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Reevaluation of the "Amyloid Cascade hypothesis". *Int J Alz Dis.* 2011: ID 630865
15. AVDULOV, N; CHOCHINA, S; IGBAVBOA, U; WARDEN, C; VASSILIEV, A; WOOD, G (1997). Lipid Binding to Amyloid β -Peptide Aggregates: Preferential Binding of Cholesterol as Compared with Phosphatidylcholine and Fatty Acids. *J Neurochem* 69: 1746-1752
16. AVILA, J; LUCAS, J; PEREZ, M; HERNANDEZ, F (2004). Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiol Rev* 84: 361-384
17. BALLABH, P; BRAUN, A; NEDERGAARD, M (2004). The blood-brain barrier: an overview Structure, Regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 13: 1-13

18. BALLATORE, C; LEE, V; TROJANOWSKI, J (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8: 663-672
19. BARGHORN, S; NIMRICH, V; STRIEBINGER, A; KRANTZ, C; KELLER, P; JANSON, B; BAHR, M; SCHMIDT, M; BITNER, R; HARLAN, J; BARLOW, E; EBERT, U; HILLEN, H (2005). Globular Amyloid β -Peptide₁₋₄₂ oligomer – a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95(3) : 834-847
20. BARTOLINI, M; BERTUCCI, C; BOLOGNESI, ML; CAVALLI, A; MELCHIORRE, C; ANDRISANO, V (2007). Insight Into the Kinetic of Amyloid β (1–42) Peptide Self-Aggregation: Elucidation of Inhibitors' Mechanism of Action. *ChemBioChem* 8: 2152-2161
21. BARTOLOMMEI, G; MONCELLI, M; TADINI-BUONINSEGNI, F (2013). A Method to measure Hydrolytic Activity of Adenosinetriphosphatases (ATPases). *PloS ONE* 8(3): e58615
22. BAYER, T. ; CAPPAL, R. ; MASTERS, C. ; BEYREUTHER, K., MULTHAUP, G (1999) It all sticks together -the APP-related family of proteins and alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 4: 524-528
23. BECHARA, C; SAGAN, S (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?. *FEBS Letters* 587: 1693-1702
24. BEN-ARI, Y (2002). Excitatory Actions of GABA During Development: The Nature of The Nurture. *Nat Rev* 3: 728-739
25. BHATTACHARJYA, S; VENKATRAMAN, J; KUMAR, A; BALARAM, P (1999). Fluoroalcohols as structure modifiers in peptides and proteins. Hexafluoroacetone hydrate stabilizes a helical conformation of Melittin at low pH. *J Pept Res.* 54: 100-111

26. BIERE, A; OSTASZEWSKI, B; STIMSON, E; HYMAN, B; MAGGIO, J; SELKOE, D (1996). Amyloid β -Peptide Is Transported on Lipoproteins and Albumin in Human Plasma. *J Biol Chem.* 271(51): 32916-32922
27. BLAESSE, P; AIRAKSINEN, M; RIVERA, C; KAILA, K (2009). Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function. *Neuron* 61: 820-838
28. BORREL, M-N; PEREIRA, E; FIALLO, M; GARNIER-SUILLEROT, A (1994a). Analysis of Multidrug Transporter in living cells. Inhibition of P-glycoprotein-mediated efflux of anthracyclines by ionophores. *Met-Based Drugs* 1(2-3): 175-182
29. BORREL, M-N; PEREIRA, E; FIALLO, M; GARNIER-SUILLEROT, A (1994b). Mobile ionophores are a novel class of P-Glycoprotein inhibitors. The effect of ionophores on 4'-O-tetrahydropyranyl-Adriamycin incorporation in K562 drug-resistant cells. *Eur J Biochem* 223: 125-133
30. BRENN, A; GRUBE, M; PETERS, M; FISCHER, A; JEDLITSCHKY, G; KROEMER, H; WARZOK, R; VOGELGESANG, S (2011). Beta-Amyloid Downregulates MDR1 P-Glycoprotein (Abcb1) Expression at the Blood-Brain Barrier in Mice. *Int J Alz Dis.* 690121
31. BU, G; CAM, J; ZERBINATTI, C (2006). LRP in Amyloid- β Production and Metabolism. *Ann N.Y. Acad Sci* 1086: 35-53
32. BUEE, L; BUSSIÈRE, T; BUEE-SCHERRER, V; DELACOURTE, A; HOF, P (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 33: 95-130
33. BUSCIGLIO, J; GABUZDA, D; MATSUDAIRA, P; YANKNER, B (1993). Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and non neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2092-2096

34. CARDOSO, F; BRITES, D; BRITO, M (2010). Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev* 64: 328-363
35. CARVEY, P; HENDEY, B; MONAHAN, A (2009). The blood-brain barrier in Neurodegenerative diseases: A Rhetorical Perspective. *J Neurochem.* 111(2): 291-314
36. CAUGHEY, B; LANSBURY, P (2003). Protofibrils, pores, fibrils and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Ann Rev Neurosci.* 26: 267-298
37. CHAMMA, I; CHEVY, Q; PONCER, J.C; LEVI, S (2012). Role of the neuronal K^+ - Cl^- co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Front Cell Neurosci.* 6: 1- 15
38. CHENG, I; SCEARCE-LEVIE, K; LEGLEITER, J; PALOP, J; GERSTEIN, H; BIEN-LY, N; PUOLIVÄLI, J; LESNE, S; ASHE, K; MUCHOWSKI, P; MUCKE, L (2007). Accelerating Amyloid- β Fibrillization Reduces Oligomer Levels and Functional Deficits in Alzheimer Disease in Mouse Models. *J. Biol. Chem.* 282(33): 23818-23828
39. CHEVALLET, M; LUCHE, S; RABILLOUD, T (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Prot.* 1(4): 1852-1858
40. CIRRITO, J; DEANE, R; FAGAN, A; SPINNER, M; PARSADANIAN, M; FINN, M; JIANG, H; PRIOR, J; SAGARE, A; BALES, K; PAUL, S; ZLOKOVIC, B; PIWNICA-WORMS, D; HOLTZMANN, D (2005). P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid- β deposition in an Alzheimer's disease mouse model. *J Clin Invest.* 115(11): 3285-3290
41. CLARK, D (2003). *In silico* prediction of Blood-Brain Barrier permeation. *Drugs Discovery Today* 8(20): 927-933

42. COSKUN, P; BEAL, F; WALLACE, D (2004). Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Nat Acad Sci. USA* 101: 10726-10731
43. CRESCENZI, O; TOMASELLI, S; GUERRINI, R; SEVERO, S; D'URSI, A; TEMUSSI, P; PICONE, D (2002). Solution structure of the Alzheimer Amyloid β -peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. *Eur J Biochem.* 269: 5642-5648
44. CROUCH, P; HARDING, S; WHITE, A; CAMAKARIS, J; BUSH, A; MASTERS, C (2008). Mechanisms of A β mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 181-198
45. CVETKOVIĆ-DOŽIĆ, D; SKENDER-GAZIBARA, M; DOŽIĆ, S (2001). Neuropathological hallmarks of Alzheimer's Disease. *Arch Oncol.* 9(3): 195-199
46. DAHLGREN, K; MANELLI, A; STINE, W; BAKER, L; KRAFFT, G, LaDu, M (2002). Oligomeric and Fibrillar species of Amyloid- β Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *J. Biol. Chem.* 277(35): 32046-32053
47. DAHVALE, S; BHOSLE, A; HARDIKAR, S; KOTKAR, T (2008). Significance of P-Glycoproteins as a Transporter System. *Research J Pharm and Tech* 1(4): 298-309
48. DEANE, R; WU, Z; SAGARE, A; DAVIS, J; YAN, S; HAMM, K, XU, F; PARISI, M; LaRUE, B; WEI HU, H; SPIJKERS, P; GUO, H; SONG, X; LENTING, P; van NOSTRAND, W; ZLOKOVIC, B (2004). LRP/Amyloid β -Peptide Interaction Mediates Differential Brain Efflux of A β Isoforms. *Neuron.* 43: 333-344

49. DEANE, R; SAGARE, A; ZLOKOVIC, B (2008). The Role of the Cell Surface LRP and Soluble LRP in Blood-Brain Barrier A β Clearance in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des.* 14(16): 1601-1605
50. DEANE, R; DUYAN, S; SUBMAMARYAN, R; LaRUE, B; JOVANOVIĆ, S; HOGG, E; WELCH, D; MANNESS, L; LIN, C; YU, J; ZHU, H; GHISO, J; FRANGIONE, S; STERN, A; SCHMIDT, A; ARMSTRONG, B; LILIENSK, A; NAWROTH, P; HOFMAN, F; KINDY, M; STERN, D; ZLOKOVIC, B (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 9: 907-913
51. DEAN, D; RZHETSKY, A; ALLIKMETS, R (2001). The Human ATP-binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res.* 11: 1156-1166
52. DEMURO, A; PARKER, I; STUTZMANN, G (2010). Calcium Signaling and Amyloid Toxicity in Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* 285(17): 12463-12468
53. DEMURO, A; SMITH, M; PARKER, I (2011). Single-channel Ca²⁺ imaging implicates A β 1-42 amyloid pores in Alzheimer's disease pathology. *J Cell Biol.* 195(3): 515-524
54. DE PAULA, V; GUIMARÃES, F; DINIZ, B; FORLENZA, O (2009). Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, tau protein or both? *Dementia and Neuropsychologia* 3(3): 188-194
55. DESHPANDE, A; MINA, E; GLABE, C; BUSCIGLIO, J (2006). Different Conformations of Amyloid β Induce Neurotoxicity by Distinct Mechanisms in Human Cortical Neurons. *J Neurosci.* 26(22): 6011-6018
56. DI CARLO, M (2010). Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur Biophys J.* 39: 877-888

57. DOIGE, C; SHAROM, F (1992). Transport properties of P-Glycoprotein in plasma membrane vesicles from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 1109: 161-171
58. DUCHEN, M (2005). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Asp Med.* 25: 365-451
59. ECKFORD, P; SHAROM, F (2009). ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs. *Chem Rev.* 109: 2989-3011
60. ESTEBAN, J (2004). Living with the enemy: a physiological role for the β -amyloid peptide. *TRENDS in Neuroscience* 27(1): 1-3
61. EYTAN, G; BORGNA, M; REGEV, R; ASSARAF, Y (1994). Transport of Polypeptide Ionophores into Proteoliposomes Reconstituted with Rat Liver P-Glycoprotein. *J Biol Chem.* 269(42): 26058-26065
62. FARMERY, M; TJERNBERG, L; PURSGLOVE, S; BERGMAN, A; WINBLAD, B; NÄSLUND, J (2003). Partial Purification and Characterization of γ -Secretase from Post-mortem Human Brain. *J Biol Chem.* 278(27): 24277-24284
63. FRIEDRICH, B; MATSKEVICH, I; LANG, F. Cell Volume Regulatory Mechanisms. An Introduction. In Lang (ed). Basel, Karger, 2006. Vol. 152, pp. 1-8
64. FUJIYOSHI, M; TACHIKAWA, M; OHTSUKI, S; ITO, S; UCHIDA, Y; AKANUMA, S; KAMIE, J; HASHIMOTO, T; HOSOYA, K; IWATSUBO, T; TERASAKI, T (2011). Amyloid- β peptide (1-40) elimination from cerebrospinal fluid involves Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 at the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *J Neurochem.* 118: 407-415

65. FUTAKI, S; SuZUKI, T; OKASHI, W; YAGAMI, T; TANAKA, S; UEDA, K; SUGIURA, Y (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem.* 276(8): 5839-5840
66. GABATHULER, R (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis.* 37: 48-57
67. GARRIGOS, M; BELEHRADEK, J; MIR, L; ORLOWSKI, S (1993). Absence of cooperativity for Mg-ATP and verapamil effects on the ATPase activity of P-glycoprotein containing membrane vesicles. *Biochem Res Comm.* 196(3): 1034-1041
68. GELLERMANN, G; BYRNES, H; STRIEBINGER, A; ULLRICH, K; MUELLER, R; HILLEN, H; BARGHORN, S (2007). A β -Globulomers are formed independently of the fibril pathway. *Neurobiol Dis.* 30: 212-220
69. GLAVINAS, H; KIS, E; PÁL, Á; KOVÁCS, R; MÁRTON, J; VÁGI, E; MOLNÁR, É; SZÁVA, B; KELE, Z; JANÁKY, T; BÁTHORY, G; VON RICHTER, O; KOOMEN, G-J; KRAJCSI, P (2007). ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein / Mitoxantrone Resistance-Associated Protein) ATPase Assay. A Useful Tool to Detect Drug-Transporter Interactions. *Drug Metabolism and Disposition* 35(9): 1533-1542
70. GOODNO, C (1982). Myosin Active-Site Trapping with Vanadate Ion. *Meth Enzymol.* 85: 116-123
71. GUO, Y; XIAO, P; LEI, S; DENG, F; XIAO, G; LIU, Y; CHEN, X; LI, L; WU, S; CHEN, Y; JIANG, H; TAN, L; XIE, J; ZHU, Y; LIANG, S; DENG, H (2008). How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin.* 40(5): 426-436

72. HAASS, C, SELKOE, D (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration : lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev.* 8: 101-112
73. HARDY, J; HIGGINS, G (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184-185
74. HARTZ, A; MILLER, D; BAUER, B (2010). Restoring Blood-Brain Barrier P-Glycoprotein Reduces Brain Amyloid- β in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Pharmacol.* 77: 715-723
75. HERCE, H; GARCIA, A; LITT, J; KANE, R; MARTIN, P; ENRIQUE, N; REBOLLEDO, A; MILESI, V (2009). Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell penetrating peptides. *Biophys J.* 97: 1917-1925
76. HIGGINS, C; GOTTESMAN, M (1992). Is the Multidrug Transporter a Flippase? *TIBS* 17: 18-21
77. HIGGINS, C; LINTON, K (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol.* 11(10): 918-926
78. HIRAI, K; ALIEV, G; NUNOMURA, A; FUJIOKA, H; RUSSELL, R; ATWOOD, C; JOHNSON, A; KRES, Y; VINTERS, H; TABATON, M; SHIMOHAMA, S; CASH, A; SIEDLAK, S; HARRIS, P; JONES, P; PETERSEN, R; PERRY, G; SMITH, M (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21: 3017-3023
79. HUNG, L; CICCOTOSTO, G; GIANNAKIS, E; TEW, D; PEREZ, K; MASTERS, L; CAPPAL, R; WADE, J; BARNHAM, K (2008). Amyloid- β Peptide ($A\beta$) Neurotoxicity is Modulated by the Rate of Peptide Aggregation: $A\beta$ Dimers and Trimers Correlate with Neurotoxicity. *J Neurosci.* 28(46): 11950-11958

80. ITO, S; OHTSUKI, S; TERASAKI, T (2006). Functional characterization of the brain-to-blood efflux clearance of human amyloid- β peptide (1-40) across the rat blood-brain barrier. *Neurosci Res.* 56: 246-252
81. ITTNER, L, GÖTZ, J (2011). Amyloid- β and tau: a toxic *pas de deux*. *Nat Rev Neurosci.* 12 : 62-72
82. JAN, A; GOKCE, O; LUTHI-CARTER, R; LASHUEL, H (2008). The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis and toxicity. *J. Biol. Chem.* 283: 28176-28189
83. JAN, A ; HARTLEY, D ; LASHUEL, H (2010). Preparation and characterization of toxic A β aggregates for structural and functional studies in alzheimer's disease research. *Nat Prot.* 5(6): 1186-1209
84. JEON, H; BLACKLOW, S (2005). Structure and Physiologic Function of the Low-Density lipoprotein Receptor. *Ann Rev Biochem.* 74: 535-562
85. JEYNES, B; PROVIAS, J (2010). An investigation into the role of P-glycoprotein in Alzheimer's disease lesion pathogenesis. *Neurosci. Lett.* 487: 389-393
86. KAGAN, B; HIRAKURA, Y; AZIMOV, R; AZIMOVA, R; LIN, M (2002). The channel hypothesis of Alzheimer's Disease: current status. *Peptides* 23: 1311-1315
87. KAWAHARA, M; ARISPE, N; KURODA, Y; ROJAS, E (1997). Alzheimer's disease Amyloid β -Protein Forms Zn^{+2} -Sensitive, Cation-Selective Channels Across Excised Membrane Patches from Hypothalamic Neurons. *Biophys J.* 73: 67-75

88. KAWAHARA, M; KURODA, Y (2000). Molecular Mechanism of Neurodegeneration Induced by Alzheimer's β -Amyloid Protein: Channel Formation and Disruption of Calcium Homeostasis. *Brain Res Bull.* 53(4): 389-397
89. KAWAHARA, M; OHTSUKA, I; YOKOYAMA, S; KATO-NEGISHI, M; SADAKANE, Y (2011). Membrane incorporation, channel formation, and disruption of calcium homeostasis by Alzheimer's β -Amyloid protein. *Int J Alz Dis.* ID 304583, 17p.
90. KHADOUMI, A; ABUZNAIT, A (2012). Role of ABC transporters in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci.* 3: 820-831
91. KHAN, J; QADEER, A; CHATURVEDIS, S; AHMAD, E; REHMAN, S, GOURINATH, S; KHAN, R (2012). SDS Can be Utilized as an Amyloid Inducer: A Case Study on Diverse Proteins. *PloS One.* 7(1): e29694
92. KHETERPAL, I ; LASHUEL, H ; HARTLEY, D; WALTZ, T; LANSBURY, P; WETZEL, R (2003). Abeta protofibrils possess a stable core structure resistant to hydrogen exchange. *Biochemistry* 42(48): 14092-14098
93. KIM, S; RHIM, H (2011). Effects of Amyloid- β Peptides on Voltage-Gated L-Type $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} Channels. *Mol Cells.* 32: 289-294
94. KLEIN, W (2002). Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int.* 41: 345-352
95. KLYUBIN, I; CULLEN, W; HU, N-W; ROWAN, M (2012). Alzheimer's disease $\text{A}\beta$ assemblies mediating rapid disruption of synaptic plasticity and memory. *Mol Brain* 5(25): 1-10

96. KNOTT, A; PERKINS, G; SCHWARZENBACHER, R; BOSSY-WETZEL, E (2008). Mitochondrial Fragmentation in Neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9(7): 505-518
97. KOLAROVA, M; GARCIA-SIERRA, F; BARTOS, A; RICNY, J; RIPOVA, D (2012). Structure and Pathology of Tau protein in Alzheimer's Disease. *Int J Alz Dis.* 13 p.
98. KREMER, J; PALLITTO, M; SKALANSKY, D; MURPHY, R (2000). Correlation of A β Aggregate size and Hydrophobicity with Decreased Fluidity of Model Membranes. *Biochemistry* 39: 10309-10318
99. KRISHNA, R; MAYER, L (2000). Multidrug Resistance (MDR) in Cancer Mechanisms Reversal Using Modulators of MDR and the Role of MDR Modulators in Influencing the Pharmacokinetics of Anticancer Drugs. *Eur J Pharmaceut Sci.* 11: 265-283
100. KUHNKE, D; JEDLITSCHKY, G; GRUBE, M; KROHN, M; JUCKER, M; MOSYAGIN, I; CASCORBI, I; WALKER, L; KROEMER, H; WARZOK, R; VOGELGESANG, S (2007). MDR-1-P-Glycoprotein (ABCB1) mediates transport of Alzheimer's Amyloid- β -peptides. Implications for the mechanisms of A β clearance at the blood-brain barrier. *Brain Pathol.* 17: 347-353
101. LACOR, P; BUNIEL, M; CHANG, L; FERNANDEZ, S; GONG, Y; VIOLA, K; LAMBERT, M; VELASCO, P; BIGIO, E; FINCH, C; KRAFFT, G; KLEIN, W. (2004). Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid β Oligomers. *J Neurosci.* 24(45) : 10191-10200
102. LACOR, P; BUNIEL, M; FURLOW, P; SANZ CLEMENTE, A; VELASCO, P; WOOD, M; VIOLA, K; KLEIN, W. (2007). A β Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 27(4) : 796-807

103. LAEMMLI, U (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
104. LAI, A; Mc LAURIN, J (2010). Mechanisms of Amyloid-Beta Peptide Uptake by Neurons : The Role of Lipid Rafts and Lipid Raft-Associated Proteins. *Int J Alz Dis*. 2011: 11p
105. LAM, F; LIU, R; LU, P; SHAPIRO, A; RENOIR, J-M; SHAROM, F ; REINER, P (2001). β -amyloid efflux mediated by P-glycoprotein. *J Neurochem*. 76 : 1121-1128
106. LAZAROV, O. et DEMARS, M. (2012). All in the family : how the APPs regulate neurogenesis. *Front Neurosci*. 6: 1-21
107. LEE, S; FERNANDEZ, E; GOOD, T (2006). Role of Aggregation Conditions in Structure Stability and Toxicity of Intermediates in the A β Fibril Formation Pathway. *Protein Sci*. 16: 723-732
108. LESLIE, E; DEELEY, R; COLE, S (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-Glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 204(3): 216-237
109. LIN, H; BHATIA, R; LAL, R (2001). Amyloid β Protein forms ion channels: Implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J* 15: 2433-2444
110. LIN, M; BEAL, F (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-795
111. LINDGREN, M; HÄLLBRINK, M; PROCHIANTZ, A; LANGEL, Ü (2000). Cell-penetrating peptides. *TIPS* 21: 99-103

112. LINTON, K (2007). Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology* 22: 122-130
113. LOO, T; CLARKE, D (2001). Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. *J Biol Chem.* 276(40): 36877-36880
114. LOZZIO, C; LOZZIO, B (1975). Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line with Positive Philadelphia Chromosome. *Blood* 45: 321-324
115. LUNDBERG, P; LANGEL, Ü (2003). A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recog.* 16: 227-233
116. MALCHIODI, A; PARADISI, S; MATTEUCCI, A; FRANK, C; DI OCIAIUTI, M (2011). Amyloid oligomer Neurotoxicity, Calcium Dysregulation and Lipid Rafts. *Int J Alz Dis.* 17 p
117. MANKHETKORN, S; GARNIER-SUILLEROT, A (1998). The ability of verapamil to restore intracellular accumulation of anthracyclines in multidrug resistant cells depends on the kinetics of their uptake. *Eur J Pharmacol.* 343: 313-321
118. MANKHETKORN, S; TEODORI, E; GARNIER-SUILLEROT, A (1999). Partial Inhibition of the P-Glycoprotein-mediated transport of anthracyclines in viable resistant K562 cells after irradiation on the presence of a verapamil analogue. *Chemico-Biol Interact.* 121: 125-140
119. MATSUZAKI, K (2007). Physicochemical Interactions of amyloid- β -peptide with lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 1768: 1935-1942

120. MICELLI, S; MELELEO, D; PICCIARELLI, V; GALLUCCI, E (2004). Effect of Sterols on β -Amyloid Peptide (A β P 1-40) Channel Formation and their Properties in Planar Lipid Bilayers. *Biophys J.* 86: 2231-2237
121. MICHIKAWA, M; GONG, J; FAN, Q; SAWAMURA, N; YANAGISAWA, K (2001). A novel action of Alzheimer's amyloid beta-protein (Abeta): oligomeric Abeta promotes lipid release. *J. Neurosci.* 21: 7226-7235
122. MILLETTI, F (2012). Cell-penetrating peptides: classes, origin and current landscape. *Drug Discov Today* 17(15-16): 850-860
123. MORGADO, I; FÄNDRICH, M (2011). Assembly of Alzheimer's A β peptide into nanostructured fibrils. *Curr Opin Colloid and Interface Sci.* 16: 508-514
124. MURPHY, M; LeVINE H (2010). Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *J. Alz Dis.* 19(1): 311-327
125. MUSSBACH, F; FRANKE, M; ZOCH, A; SCHAEFFER, B; REISSMANN, S (2011). Transduction of peptides and proteins into live cells by cell-penetrating peptides. *J Cell Biochem.* 112: 3824-3833
126. NAZER, B; HONG, S; SELKOE, D (2008). LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid- β peptide in a blood-brain barrier *in vitro* model. *Neurobiol Dis.* 30(1): 94-102
127. NEKULA, M; KAYED, R; MILTON, S; GLABE, C (2007). Small molecule Inhibitors of Aggregation Indicate That Amyloid β Oligomerization and Fibrillization Pathways Are Independent and Distinct. *J. Biol. Chem.* 282(14): 10311-10324

128. NELSON, P; ALAFUZOFF, I; BIGIO, E; BOURAS, K; BRAAK, K; CAIRNS, N; CASTELLANNI, R; CRAIN, B; DAVIES, P; DEL TREDICI, K; DUYCKAERTS, P; FROSCH, M; HAROUTUNIAN, V; HOF, P; HULETTE, C; HYMAN, B; IWATSUBO, T; JELLINGER, K; JICHA, G; KÖVARI, E; KUKUL, N; LEVERENZ, J; LOVE, S; MACKENZIE, I; MANN, D; MASLIAH, E; Mc KEE, A; MONTINE, T; MORRIS, J; SCHNEIDER, J; SONNEN, J; THAL, D; TROJANOWSKI, J; TRONCOSO, J; WISNIEWSKI, T; WOLTJER, R; BEACH, T (2012). Correlation of Alzheimer's Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A review of the Litterature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 71(5): 362-381
129. NICHOLLS, D ; WARD, M (2000). Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *TINS* 23(4): 166-174
130. NIEDOWICZ, D; NELSON, P; MURPHY, P (2011). Alzheimer's Disease: Pathologival Mechanisms and Recent Insights. *Curr Neuropharm* 9: 674-684
131. NIKOLAEV, A. ; Mc LAUGHLIN, T.; O'LEARY, D.; TESSIER LAVIGNE, M (2009) APP binds BR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457: 981-989
132. O'BRIEN, R. Et WONG, P. (2011). Amyloid precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* 34:185-204
133. OH, E.; SAVONENKO, A; KING, J.; FANGMARK TUCKER, S; RUDOW, G; XU, G.; BORCHELT, D.; TRONCOSO, J (2009) Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *Neurobiol Aging* 30: 1238-1244

134. OHTSUKI, S; ITO, S; TERASAKI, T (2010). Is P-Glycoprotein involved in Amyloid- β Elimination Across the Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *Nat Clin Pharmacol Therapeutics*. 88 (4): 443-445
135. ORLANDI, F ; CORONNELLO, M ; BELLUCCI, C ; DEI, S ; GUANDALINI, L ; MANETTI, D ; MARTELLI, C ; ROMANELLI, M ; SCAPECCHI, S ; SALERNO, M ; MENIF, H ; BELLO, I ; MINI, E ; TEODORI, E (2013). New Structure-Activity Relationship Studies in a Series of N,N-bis(cyclohexanol)amine aryl esters as potent reversers of P-Glycoprotein-mediated multidrug resistance (MDR). *Bioorg Med Chem*. 21: 456-465
136. OUDE ELFERINK, R; ZADINA, J (2001). MDR1 P-Glycoprotein Transports Endogenous Opioid Peptides. *Peptides* 22: 2015-2020
137. PAHNKE, J; WOLKENHAUER, O; KROHN, M; WALKER, L (2008). Clinico-Pathologic Function of Cerebral ABC Transporters. Implications for the Pathogenesis in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer. Res*. 5(4): 396-405
138. PALOP, P, MUCKE, L (2010). Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 13(7): 812-818
139. PAPPENHEIMER, A (1917). Experimental studies upon lymphocytes. The reactions of lymphocytes under various experimental conditions. *J Exp. Med*. 25: 633-650
140. PERL, D (2010). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med*. 77(1): 32-42
141. PERRY, S; NORMAN, J; BARBIERI, J; BROWN, E; GELBARD, H (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50(2): 98-115
142. PIMPLIKAR, S (2009). Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1261-1268

143. PLANT, L; BOYLE, J; SMITH, I; PEERS, C; PEARSON, H (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 23: 5531-5535
144. POOJARI, C ; XIAO, D ; BATISTA, V ; STRODEL, B (2013). Membrane Permeation Induced by Aggregates of Human Islet Amyloid Polypeptides. *Biophys J* 105: 2323-2332
145. RABILLOUD, T; CARPENTIER, G; TARROUX, P (1988). Improvement and simplification of low-background Silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* 9: 288-291
146. RANGACHARI, V; MOORE, B; KIM REED, D; SONODA, L; BRIDGES, A; CONBOY, E; HARTIGAN, D; ROSENBERRY, T (2007). Amyloid- β (1-42) Rapidly Forms protofibrils and Oligomers by Distinct Pathways in Low Concentrations of sodium Dodecylsulfate. *Biochemistry* 46: 12451-12462
147. REDDY, P; BEAL, M (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's Disease. *Trends Mol Med* 14(2): 45-53
148. REDDY, P (2009). The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's Disease. *CNS Spectr.* 14: 8-18
149. REINHARD, C.; HEBERT, S.; DE STROOPER, B (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* 24: 3996-4006
150. RHEIN, V; SONG, X, WIESNER, A; ITTNER, L; BAYSANG, G; MEIER, F; OZMEN, L; BLUETHMANN, H; DRÖSE, S; BRANDT, U; SAVASKAN, E; CZECH, C; GÖTZ, J; ECKERT, A (2009). Amyloid- β and tau synergistically impair the oxydative

phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc Nat Acad Sci.* 106(47): 20057-20062

151. ROGERS, J; STROHMEYER, R; KOVELOWSKI, C; LI, R (2002). Microglia and Inflammatory Mechanisms in the Clearance of Amyloid- β Peptide. *GLIA* 40: 260-269

152. ROYCHAUDHURI, R; YANG, M; HOSHI, M; TELOW, D (2009). Amyloid β -Protein Assembly and Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem* 284(8): 4749-4753

153. RUSS, G; RAMACHANDRA, M; HRYCYNA, C; GOTTESMAN, M; PASTAN, I; BENNINK, J; YEWDELL, J (1998). P-Glycoprotein Plays an Insignificant Role in the Presentation of Antigenic Peptides to CD8⁺ T Cells. *Cancer Res.* 58: 4688-4693

154. RYAN, D; NARROW, W; FEDEROFF, H; BOWERS, W (2010). An Improved Method for Generating Consistent Soluble Amyloid-beta Oligomer Preparations for *In Vitro* Neurotoxicity Studies. *J. Neurosci Methods.* 190(2): 171-179

155. SAKONO, M; ZAKO, T (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS J.* 277: 1348-1358

156. SANGRAM, S (1992). β -Amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6075-6079

157. SARKADI, B; PRICE, E; BOUCHER, R; GERMANN, U; SCARBOROUGH, G (1992). Expression of the Human Multidrug Resistance cDNA in Insect Cells Generates a High Activity Drug-Stimulated Membrane ATPase. *J Biol Chem.* 267(7): 4854-4858

158. SARKADI, B; MÜLLER, M; HOMOLYA, L; HOLLÓ, Z; SEPRÓDI, J; GERMANN, U; GOTTESMAN, M; PRICE, E; BOUCHER, C (1994). Interaction of bioactive hydrophobic peptides with the human multidrug transporter. *FASEB J.* 8: 766-770

159. SAUNA, Z; AMBUDKAR, S (2001). Characterization of the Catalytic Cycle of ATP Hydrolysis by Human P-Glycoprotein: the two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different outcomes. *J Biol Chem.* 276(15): 11653-11661
160. SAUNA, Z; ANDRUS, M; TURNER, T; AMBUDKAR, S (2004). Biochemical basis of polyvalency as a strategy for enhancing the efficacy of P-Glycoprotein (ABCB1) modulators: stipiamide homodimers separated with defined-length spacers reverse drug efflux with greater efficacy. *Biochemistry* 43: 2262-2271
161. SCHINKEL, A (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Delivery Reviews* 36: 179-194
162. SCHINKEL, A; JONKER, J (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Delivery Reviews* 55: 3-29
163. SCHMIDT, N; MISHRA, A; LAI, G; WONG, G (2010). Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett.* 584: 1806-1813
164. SELKOE, D (2001). Alzheimer's Disease : Genes, Proteins and Therapy. *Physiol Rev.* 81(2):741-766
165. SEPULVEDA, F; PARODI, J; PEOPLES, R; OPAZO, C; AGUAYO, L (2010). Synaptotoxicity of Alzheimer Beta Amyloid Can Be Explained by Its Membrane Perforating Property. *PLoS ONE* 5(7): 11820-11828
166. SEUBERT, P; VIGO-PELTREY, C; ESCH, F; LEE, M; DOVEY, H; DAVIS, D; SINHA, S; SCHLOSSMACHER, M; WHALEY, J; SCHENK, D (1992). Isolation and Quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature* 359: 325-327

167. SHAROM, F; DiDIODATO, G; YU, X; ASHBOURNE, K (1995). Interaction of the P-glycoprotein Multidrug Transporter with Peptides and Ionophores. *J Biol Chem.* 270(17): 10334-10341
168. SHAROM, F; YU, X; DiDIODATO, G; CHU, J (1996). Synthetic Hydrophobic Peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate Drug Transport. *Biochem J.* 320: 421-428
169. SHAROM, F; LU, P; LIU, R; YU, X (1998). Linear and Cyclic Peptides as Substrates and Modulators of P-Glycoprotein: Peptide binding and effects on drug transport and accumulation. *Biochem J.* 333: 621-630
170. SHAROM, F (2008). ABC multidrug transporters; structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenetics* 9(1): 105-127
171. SHEN, C-L; MURPHY, R (1995). Solvent Effects on Self-Assembly of β -Amyloid Peptide. *Biophys J.* 69: 640-651
172. SHIBATA, M; YAMADA, S; BADING, J; CALERO, M; FRANGIONE, B; HOLTZMAN, D; GHISO, G; ZLOKOVIC, B (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid β (1-40)-peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 106: 1489-1499
173. SHIRWANY, N; PAYETTE, D; XIE, J; GUO, Q (2007). The amyloid beta ion channel hypothesis of Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Dis Treat.* 3(5): 597-612
174. SIMAKOVA, O; ARISPE, N (2006). Early and Late Cytotoxic Effects of External Application of the Alzheimer's A β Result from the Initial Formation and Function of A β Ion Channels. *Biochemistry* 45: 5907-5915

175. SIMAKOVA, O; ARISPE, N (2007). The Cell Selective Neurotoxicity of the Alzheimer's A β Peptide Is Determined by Surface Phosphatidylserine and Cytosolic ATP Levels. Membrane Binding Is Required for A β Toxicity. *J Neurosci.* 27(50): 13719-13729
176. SIMON, S; SCHINDLER, M (1994). Cell Biological Mechanisms of Multidrug Resistance in Tumors. *Proc Nat Acad Sci. USA* 91: 3497- 3504
177. SOLITO, E; SASTRE, M (2012). Microglia function in Alzheimer's disease. *Front Pharmacol.* 3: 1-10
178. SPERLING, R; AISEN, P; BECKETT, L; BENNETTI, D; CRAFT, S; FAGAN, A; IWATSUBO, T; JACK, C; KAYE, J; MONTINE, T; PARK, D; REIMAN, E; ROWE, C; SIEMERS, E; STERN, Y; YAFFE, K; CARRILLO, M; THIES, B; MORRISON, M; WAGSTER, M; PHELPS, C (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute of Aging and the Alzheimer's Association workgroup. *Alzheimer's & Dementia* 1-13
179. STAINS, C; MONDAL, K; GHOSH, I (2007). Molecules that Target beta-Amyloid. *ChemMedChem* 2: 1674-1692
180. STAUD, F; CECKOVA, M; MICUDA, S; PAVEK, P (2010). Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics. *Methods Mol Biol.* 596: 199-222
181. STECK, T; WEINSTEIN, R; STRAUSS, J; WALLACH, D (1970). Inside-out Red Cell Membrane Vesicles: Preparation and Purification. *Science* 168(3928): 255-257
182. STINE, W; DAHLGREN, K; KRAFFT, G; LaDu, M (2003). In Vitro Characterization of Conditions for Amyloid- β Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 178(13): 11612-11622

183. SZAKACS, G; PATERSON, J; LUDWIG, J; BOOTH-GENTHE, C; GOTTESMAN, M (2006). Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 5: 219- 234
184. TEODORI, E; DEI, S; SCAPECCHI, S; GUALTIERI, F (2002). The Medicinal Chemistry of Multidrug Resistance (MDR) Reversing Drugs. *Il Farmaco* 57: 385-415
185. THINAKARAN, G.; KOO, E (2008). Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing and Function. *J Biol Chem* 283(4): 29615-29619
186. THOMAS, H; COLEY, M (2003). Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein. *Cancer Control* 10(2): 159- 165
187. TSURUO, T; IIDA, H; TSUKAGOSHI, S; SAKURAI, Y (1981). Overcoming of Vincristine Resistance in P388 Leukemia in vivo and in vitro Through Enhanced Cytotoxicity of Vincristine and Vinblastine by Verapamil. *Cancer Res.* 41: 1967- 1972
188. TSURUO, T; IIDA, H; NOJIRI, M; TSUKAGOSHI, S; SAKURAI, Y (1983). Potentiation of Vincristine and Adriamycin in Human Hematopoietic Cell Lines by Calcium Antagonists and Calmodulin Inhibitors. *Cancer Res.* 43: 2267- 2272
189. URBATSCH, I; AL-SHAWI, M; SENIOR, A (1994). Characterization of the ATPase activity of purified chinese hamster P-glycoprotein. *Biochemistry* 33(23): 7069-7076
190. VARMA, M; ASHOKRAJ, Y; DEY, C; PANCHAGNULA, R (2003). P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol. Res.* 48: 347-359
191. VERDIER, Y; ZARANDI, M; PENKE, B (2004). Amyloid β peptide Interactions with Neuronal and Glial Cell Plasma Membrane: Binding Sites and Implications for Alzheimer's Disease. *J Pept Sci.* 16: 229-248

192. VERKMAN, A.S; SELLERS, M.C; CHAO, A.C; LEUNG, T; KETCHAM, R (1989). Synthesis and Characterization of Improved Chloride-Sensitive Fluorescent Indicators for Biological Applications. *Analytical Biochemistry* 178: 355- 361
193. VOGELGESANG, S; CASCORBI, I; SCHROEDER, E; PAHNKE, J; KROEMER, H; SIEGMUND, W; KUNERT-KEIL, C; WALKER, L; WARZOK, R (2002). Deposition of Alzheimer's β -Amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains in elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* 12: 535-541
194. WALRANT, A; VOGEL, A; CORREIA, I; LEQUIN, O; OLAUSSON, B; DESBAT, B; SAGAN, S; ALVES, I (2012). Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities. *Biochim Biophys Acta*. 1818: 1755-1763
195. WALSH, D; HARTLEY, D; KUSUMOTO, Y; FEZOU, Y; CONDRON, M; LOMAKIN, A; BENEDEK, G; SELKOE, D; TELOW, D (1999). Amyloid β -Protein Fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.* 274(36): 25945-25952
196. WALSH, D; SELKOE, D (2004). Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron* 44: 181-193
197. WANG, S; CHEN, Y-T; CHEN, P-H; LIU, K-N (2006). A kinetic study on the aggregation behavior of β -amyloid peptides in different initial solvents environments. *Biochem Engin J* 29: 129-138
198. WEINTRAUB, B; WICKLUND, A; SALMON, D (2012). The Neuropsychological Profile Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006171

199. WEISS, N; MILLER, F; CAZAUBON, S; COURAUD, P-O (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1788(4): 842-857
200. WESSLER, J; GRIP, L; MENDELL, J; GIULIANO, R (2013). The p-Glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. *J Am College Cardiol* 61(25): 2495-2502
201. WILLIAMS, A; SEGA, M; CHEN, M; KHETERPAL, I; GEVA, M; BERTHELIER, V; KALETA, D; COOK, K; WETZEL, R (2005). Structural properties of A β protofibrils stabilized by a small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(20): 7115-7120
202. WIMO, A; JÖNSEN, L; BOND, J; PRINCE, M; WINBLAD, M (2013). The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimer's & Dementia* 9: 1-11
203. WOLFE, M (2006). The γ -Secretase Complex: Membrane-Embedded Proteolytic Ensemble. *Biochemistry* 45(26): 7931-7939
204. WU, J; BREYDO, L; ISAS, J; LEE, J; KUZNETSOV, Y; LANGEN, R; GLABE, C (2010). Fibrillar Oligomers Nucleate the Oligomerization of Monomeric Amyloid β but Do Not Seed Fibril Formation. *J. Biol. Chem.* 285(9): 6071-6079
205. WOLF, A; HARTZ, A; BAUER, B (2012). ABC transporters and the Alzheimer's disease enigma. *Front in Psychiatry* 3: 1-14
206. YAMAMOTO, N; HASEGAWA, K; MATSUZAKI, K; NAIKI, H; YANAGISAWA, K (2004). Environment and mutation-dependent aggregation behavior of Alzheimer amyloid β -protein. *J Neurochem* 90: 62-69
207. YAMAMOTO, N; MATSUBARA, E; MAEDA, S; MINAGAWA, H; TAKASHIMA, A; MARUYAMA, W; MICHIKAWA, M; YANAGISAWA, K (2007). A ganglioside-

induced soluble Abeta assembly. Its enhanced formation from Abeta bearing the Arctic mutation. *J. Biol. Chem* 282: 2646-2655

208. YANIGISAWA, K (2007). Role of Gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1768: 1943-1951

209. YU, s (2003). Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol*. 70: 363-386

210. ZHANG, N-Y; KITAGAWA, K; WU, B; XIONG, Z-M; OTANI, H; INAGAKI, C (2006). Chloride-dependency of amyloid β protein-induced enhancement of glutamate neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 399: 175-180

211. ZHANG, Y.; THOMPSON, R.; ZHANG, H; XU, H (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4:1-13

212. ZHAO, L; WAI, H; MU, Y; CHEN, L (2012). The toxicity of Amyloid β Oligomers. *Int J Mol Sci*. 13: 7303-7327

213. ZHENG, H. et KOO, E. (2011) Biology and Pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegeneration*. 6: 1-16

214. ZLOKOVIC, B (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Diseases. *Neuron* 57: 178-201